

**NATRIUMFLÜSSE AN DER ÄUSSEREN
OBERFLÄCHE DER ISOLIERTEN FROSCHHAUT
UND IHRE BEZIEHUNG ZUM TRANSEPITHELIALEN
NATRIUMTRANSPORT**

Roger Rick

München

1974

Aus dem Physiologischen Institut der Universität München

Direktoren: Professor Dr.med. K. Kramer

Professor Dr.med. K. Thureau

NATRIUMFLÜSSE AN DER ÄUSSEREN OBERFLÄCHE DER ISOLierten
FROSCHAUT UND IHRE BEZIEHUNG ZUM TRANSEPITHELIALEN
NATRIUMTRANSPORT



INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Roger Rick

aus

München

1973



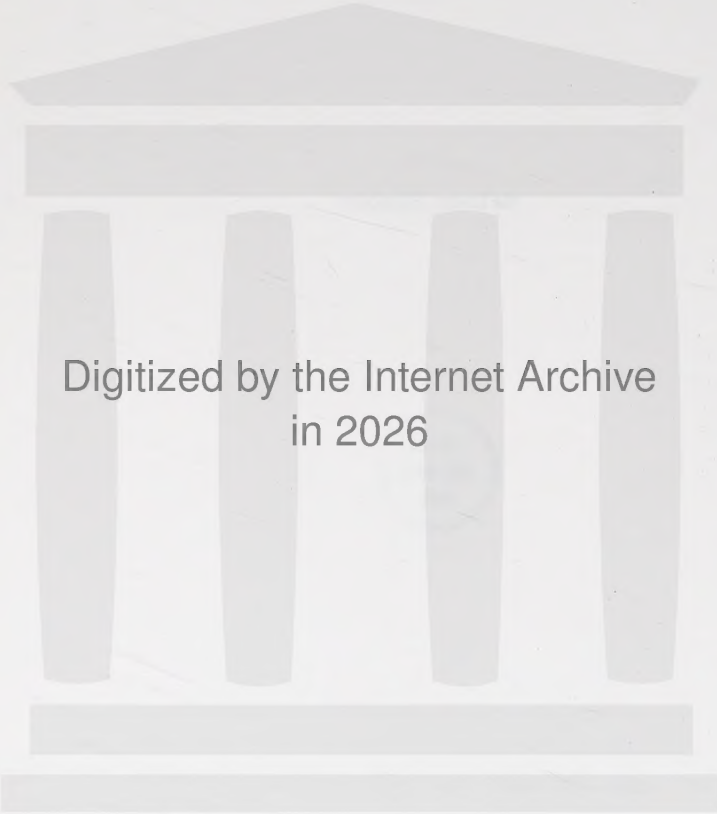
Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität München

Berichterstatter: Professor Dr.K. Thureau

Dekan: Professor Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 12. März 1974

Meinen Eltern



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551921_0021

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I) EINLEITUNG	1
II) LITERATURÜBERSICHT UND PROBLEMSTELLUNG	3
III) METHODE	
1. Biologisches Objekt und seine Präparation	18
2. Versuchsanordnung	20
2.1. Rahmen	20
2.2. Flutkammer	20
2.3. Messung der elektrischen Parameter	25
2.4. Infusions- und Absaugvorrichtung	25
3. Lösungen	27
4. Versuchsdurchführung	28
4.1. Vorlauf	28
4.2. Fluten	30
5. Auswertung	32
5.1. Statistik	32
6. Theorie der Methode	35
6.1. Allgemeine Ableitung der j_{12} -Bestimmung	35
6.2. j_{12} -Bestimmung mit Hilfe von ECR-Markern	37
6.3. j_{12} -Bestimmung mit der Flutmethode	38
6.4. Zur Methodik der j_{12} -Bestimmung bei den vorliegenden Versuchen	39
6.4.1. Korrektur des extracellulär gelegenen $^{*}\text{Na}$	39
6.4.2. Ermittlung des j_{12}	41
6.4.3. Kurzschlußbedingungen	44
6.5. Inhomogenität des biologischen Objektes	45
6.5.1. SCC-Korrektur	47
6.5.2. Intercept, $^{*}\text{Na}_{\text{ECR}}$	51
6.5.3. Randeffekte	56

	Seite
7. Meßfehler	59
7.1. Kurzschlußstrom	59
7.2. Spezifische Aktivität	59
7.3. Traceraufnahme der Hautstücke	60
7.4. Kontaktzeit	61
IV) ERGEBNISSE	62
1. j_{12} bei Normalbedingungen	62
2. j_{12} der nicht-kurzgeschlossenen Haut	67
3. j_{12} und SCC bei der Transportinhibition durch Kälte	67
4. j_{12} und SCC bei Transportinhibition mit Amilorid	69
5. j_{12} und SCC bei Transportinhibition mit Strophantin	70
6. j_{12} und SCC bei niedriger Natriumkonzentration	72
7. Natriumtransportpool am isolierten Epithel der Froschhaut	74
8. Natriumaufnahme der Gesamthaut nach Langzeitinkubation in natriumfreier Ringerlösung	77
V) DISKUSSION	81
1. Beziehung zwischen j_{12} und SCC (Variationsanalyse)	81
2. Natriumflüsse über die äußere Barriere bei Kontrollbedingungen und Variation der Transportleistung	87
3. Kompartimentanalyse	95
VI) ZUSAMMENFASSUNG	107
VII) ANHANG	109
1. Abkürzungen, Maßeinheiten	109
2. Literaturangaben	110

I) EINLEITUNG

Membranfunktion und Stoffwechsel tierischer Zellen sind an eine bestimmte Zusammensetzung ihrer Umgebungsflüssigkeit gebunden. Dieses "Milieu intérieur" (Claude Bernard) entspricht in der ionalen Zusammensetzung dem Urmeer, in dem das Leben entstand. Hauptkation der Extracellulärflüssigkeit ist Natrium, das zusammen mit den zugehörigen Anionen etwa 95% der osmotisch wirk-samen Teilchen ausmacht. Beim Übergang auf das nahezu salzfreie Süßwasser entwickelten die tierischen Organismen Mechanismen, um die hohe Salinität ihrer Gewebsflüssigkeit auch gegen einen hohen Konzentrationsgradienten aufrecht erhalten zu können. Wichtigster Mechanismus ist dabei ein einwärts gerichteter Na-triumtransport an den Grenzflächen des Organismus zur Umgebung ("Milieu extérieur"). Dieser natriumkonservierende Mechanismus wurde in der weiteren Evolution von den Amphibien und Landtie-ren beibehalten. Der menschliche Organismus hält die Natrium-konzentration in seinen extrazellulären Flüssigkeiten in engen Grenzen (Serum: 142 ± 4 meq/l (43)) konstant, wobei die Regula-tion im Wesentlichen über eine variable Natriumreabsorption in der Niere erfolgt. Zusätzlich existieren natriumkonservierende Mechanismen in den Epithelien des Darmtraktes und der exokrinen Drüsen.

Seitdem bekannt ist, daß die Froschhaut ebenfalls einen einwärts gerichteten, transzellulären Natriumtransport aufweist, ist sie wegen ihrer leichten Handhabbarkeit häufig zu Modellversuchen des aktiven Natriumtransportes verwendet worden. Im Gegensatz zu anderen Natriumtransportierenden Epithelien (z.B. Tubulus-epithel der Niere) kann die Froschhaut leicht in großen Flächen präpariert und isoliert untersucht werden. Die bisherigen Un-tersuchungen haben gezeigt, daß das Transportverhalten der Froschhautepidermis in mancher Hinsicht mit dem der Nierentubuli vergleichbar ist.

Aufgabe der vorliegenden Arbeit ist es, Aufschlüsse über Ein-zelschritte des transzellulären Natriumtransportes an der Froschhaut zu gewinnen. Im Vordergrund steht die Analyse der

Natriumflüsse über die äußere Barriere (äußere Zellmembran der Stratum granulosum-Zellen). Der Natriumeinstrom in die Haut (j_{12}) wird auf direkte Weise gemessen. Durch die gleichzeitige Bestimmung des Kurzschlußstroms (Maß für die Differenz der unidirektionalen Flüsse) wird die Ermittlung des simultanen Natriumausstroms aus der Haut (j_{21}) ermöglicht. Diese Messungen wurden unter Kontrollbedingungen und bei Variation der Transportleistungen durchgeführt. Das Verhalten von j_{12} und j_{21} wurde unter Berücksichtigung der Wirkungsmechanismen einiger bekannter Transportinhibitoren (Amilorid, Strophantin) analysiert.

Zweitens wird das in der Froschhaut funktionell in den Transport eingeschaltete Natrium bestimmt. Dazu werden zwei von den üblichen Methoden abweichende Transportpoolbestimmungen beschrieben.

Aus beiden Ergebnissen lassen sich Schlüsse auf Art und Weg des transepithelialen Natriumtransportes ziehen. Die Übertragung der Erkenntnisse auf andere natriumtransportierende Epithelien bleibt vergleichenden Untersuchungen vorbehalten.

II) LITERATURÜBERSICHT UND PROBLEMSTELLUNG

Die isolierte Froschhaut kann zwischen Epithel- und Coriumseite eine Potentialdifferenz aufrechterhalten, wobei die Coriumseite im allgemeinen 10 - 100 mV positiv zur Epithelseite geladen ist. 1848 wurde dieses Potential von Du Bois Reymond (8) zum ersten Mal beschrieben. Galeotti (40) zeigte bereits 1904, daß die Bildung dieser Potentialdifferenz von der Anwesenheit von Natrium- oder Lithiumionen in den Badelösungen abhing. Huf (47) und Krogh (58, 59) wiesen Mitte der dreißiger Jahre nach, daß die Froschhaut außerdem aus der äußeren Umgebungsflüssigkeit Natriumchlorid entgegen einem Konzentrationsgradienten aufnehmen kann.

Die Natur dieses Resorptionsvorganges konnte genauer analysiert werden, nachdem radioaktive Isotope für die selektive Untersuchung von Einstrom und Ausstrom der Elektrolyte zur Verfügung standen. Ussing (80) zeigte bei derartigen unidirektionalen Flußmessungen an isolierten Froschhautstücken, daß der Einstrom von Natrium- und Chloridionen aus der Badelösung der Epithelseite in die Badelösung der Coriumseite der Haut (im Folgenden als "Influx" bezeichnet) den entgegengesetzten Ausstrom ("Efflux") bei Weitem übertrifft. Der Influx von Natrium war dabei meist größer als der Influx von Chlorid.

Die Beobachtung, daß Natrium selbst gegen große elektrische und Konzentrationsgradienten von der Haut aufgenommen wurde, führte Ussing zu der Annahme eines aktiven Aufnahmemechanismus für Natrium. Da die Aufnahme von Anionen auf Grund der elektrochemischen Gradienten erklärbar war (80, 81), mußte sie nicht notwendigerweise aktiv erfolgen.

Ussing und Zerahn (82) gaben 1951 eine Versuchsanordnung an, mit der aktive Transportvorgänge an biologischen Membranen selektiv untersucht werden können.

Das Prinzip dieser Kurzschlußanordnung (Abb. 1) beruht darauf, daß äußere Faktoren, die ein Ungleichgewicht der unidirektionalen Flüsse bewirken könnten, eliminiert werden. Tritt bei Abwe-

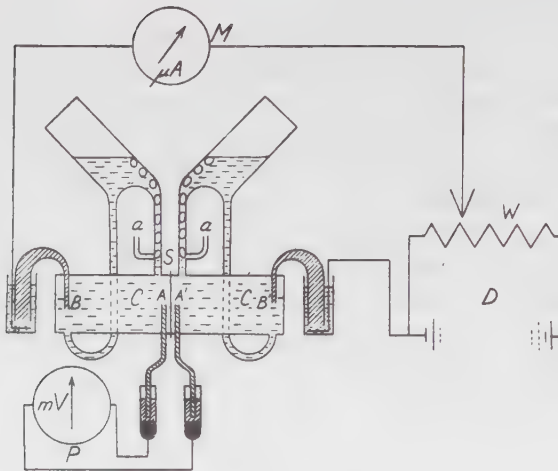


Abb. 1: Kurzschlußstromanordnung nach Ussing

aus: Ussing, H.H., und K. Zerahn (82)

C Kammer

S Froschhaut

a Lufteinlaß

A,A' Agar-Ringer-Brücken, die die Badelösungen mit den
Kalomel-Elektroden verbinden

B,B' Agar-Ringer-Brücken zu den Stromelektroden

D Batterie

W Spannungsteiler

M Mikroamperemeter

P mV-Meter

senheit äußerer Gradienten dennoch eine Differenz von Influx und Efflux auf, so ist sie auf eine aktive Transportleistung der Membran zurückzuführen.

Das Auftreten von Konzentrationsgradienten wird durch Verwendung von identischen Badelösungen auf beiden Seiten der Haut

(normalerweise Froschplasma-isotone Ringerlösung) vermieden. Das spontan entstehende Potential wird in der Ussing'schen Anordnung durch eine Gegenstromkompensation ("voltage clamp") beseitigt:

Mit Hilfe einer äußeren Stromquelle (D in Abb. 1) wird ein variabler Strom in die Ussing-Kammer eingespeist, dessen Größe und Polung so gewählt werden, daß das Potential zwischen beiden Kammerhälften auf Null reduziert wird. Der im äußeren Teil des Stromkreises gemessene (M) elektrische Strom wird als Kurzschlußstrom (SCC = short-circuit current) bezeichnet, da durch die Haut eine Ladungsverschiebung stattfindet, obwohl (in Analogie zum elektrischen Kurzschluß) keine Potentialdifferenz besteht.

Unter diesen Bedingungen (Kurzschlußbedingungen) war eine Nettoresorption von Chlorid nicht zu beobachten.*

Die Chloridaufnahme der nicht kurzgeschlossenen Froschhaut beruht somit auf einer Einwärtsdiffusion entlang dem durch den aktiven Natriumtransport geschaffenen elektrischen Gradienten (52). Für das Natrium konnte auch unter Kurzschlußbedingungen eine Differenz der unidirektionalen Flüsse gemessen werden, was den aktiven Charakter der Natriumaufnahme bewies.

Ussing und Zerahn (82) wiesen die Äquivalenz von Netto-Natriumtransport und Kurzschlußstrom unter Normalbedingungen nach. Diese Identität von Ladungsverschiebung (SCC) und Netto-Natriumfluß über die Haut bei Abwesenheit eines elektrochemischen Gradienten konnte bei Messungen im steady state unter allen experimentellen Bedingungen beobachtet werden (53, 51, 55, 68, 23, 19). Mit dem Kurzschlußstrom steht damit ein leicht bestimmbarer Parameter zur Quantifizierung des transepithelialen Natriumtransportes zur Verfügung.

*Neuere Befunde zeigen jedoch, daß die Epidermis einiger Froschspecies auch unter diesen Bedingungen, allerdings nur in geringem Ausmaße, eine aktive Chloridresorption zeigt (89, 30).

Der Mechanismus des aktiven transepithelialen Natriumtransportes der Froschepidermis wurde seitdem von mehreren Arbeitsgruppen näher untersucht. Koefoed-Johnsen und Ussing (55) schlugen 1958 ein Modell des Aufnahmemechanismus vor, dessen Grundzüge auch auf andere natriumtransportierende Epithelien übertragen wurde. Dieses Ussing'sche 3-Kompartiment-Modell beruhte auf folgenden Befunden:

- Die äußere Oberfläche der Froschhaut verhält sich wie eine Natriumelektrode: Bei einer Änderung der Natriumkonzentration in der äußeren Badelösung ändert sich das Froschhautpotential proportional zum Logarithmus der Natriumkonzentration (55, 50, 62). Die Coriumseite der Froschhaut zeigt die Charakteristik einer Kaliumelektrode (55, 50).
- Der aktive Natriumtransport und der Sauerstoffverbrauch der Haut sind zueinander proportional (90, 60, 99).
- Stoffwechselinhibitoren hemmen den transepithelialen Natriumtransport, wobei der unidirektionale Efflux sich nicht ändert (39).
- Kalium wird unter Kurzschlußbedingungen nicht transportiert. Kaliumkonzentrationen in den Badelösungen unter 1 meq/l reduzieren jedoch den Natriumtransport (48).
- Das Froschhautpotential steigt an, wenn in den Badelösungen das permeable Chloridion gegen das impermeable Sulfation ausgetauscht wird (83).

Die auf diesen Befunden basierende Modellvorstellung der aktiven Natriumresorption der Froschhaut wird in Abbildung 2 dargestellt:

- Das Natrium geht bei seinem Weg durch die Haut durch ein intrazelluläres Kompartiment (hier mit 2 bezeichnet).
- Dieses Kompartiment wird von der Außenlösung 1 und der Innenlösung 3 durch zwei Barrieren abgegrenzt:
Einer äußeren natriumpermeablen und für Kalium impermeablen Barriere -
und einer inneren, für Kalium permeablen, natriumimpermeablen Barriere.
- Natrium strömt über die äußere Barriere passiv in die Zelle

ein und wird über die innere Barriere im Austausch gegen Kalium unter Verbrauch von Stoffwechselenergie heraustransportiert.

- Kalium rezirkuliert über die innere Barriere.

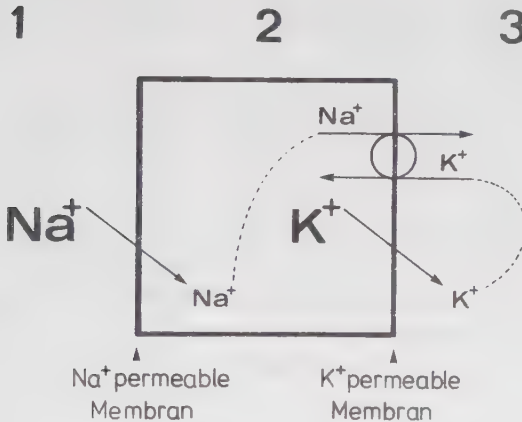


Abb. 2: 3-Kompartiment-Modell nach Koefoed-Johnsen, Ussing (55)

- 1 Epitheliale Badelösung
- 2 Transportkompartiment der Haut
- 3 Coriumseitige Badelösung

Der transepitheliale Natriumeinstrom und die Kaliumflüsse an der inneren Barriere (Membran) sind im Schema eingetragen. Weitere Erläuterung im Text.

Die transepitheliale Potentialdifferenz sollte sich nach der Ussing'schen Hypothese aus zwei Einzelpotentialen zusammensetzen: Ein Natriumdifusionspotential der äußeren Barriere und ein Kaliumdifusionspotential der inneren Barriere. Potentialprofile, die bei Punktion der Haut mit Mikroelektroden erhalten werden konnten (28, 45) zeigten, daß das Gesamtpotential der Haut aus zwei etwa gleich großen positiven Potentialsprüngen

resultierte. Da beide Barrieren für Chlorid permeabel sind, wird das Hautpotential bei chloridhaltigen Badelösungen durch einen teilweisen Kurzschluß der einzelnen Elektrodenpotentiale vermindert.

Die äußere und innere Barriere dieses 3-Kompartiment-Modells sollte von der äußeren und inneren (basalen) Zellmembran der Stratum germinativum-Zellen gebildet werden.

Unabhängig von der Lokalisation und der Beschaffenheit der einzelnen Barrieren läßt sich - von der Grundannahme ausgehend, daß es ein Transportkompartiment in der Haut gibt (Kompartiment 2) - eine 3-Kompartiment-Analyse durchführen, wie sie von Schoffeniels (77) für ein homogenes System angegeben wurde. Mit Hilfe dieser Analyse können aus Messungen des zeitlichen Verlaufes des Flußaufbaus der transepithelialen Tracerflüsse (kinetische Analyse), Poolbestimmungen des von der Haut aufgenommenen Natriums und Auswaschversuchen der von der Haut aufgenommenen Tracermengen Aussagen über die Einzelflüsse über jede der Barrieren gemacht werden. In Abbildung 3 sind diese unimembranal Flüsse, j_{12} und j_{21} , über die äußere Barriere und j_{23} und j_{32} über die innere Barriere neben den unmittelbar meßbaren transepithelialen Natriumflüssen j_{13} und j_{31} in ein 3-Kompartiment-Schema eingetragen.

Auf Grund von Befunden, die vor allem die morphologische Identität des Transportkompartments und die Lokalisation seiner äußeren und inneren Barrieren betrafen, mußte das ursprüngliche Ussing'sche 3-Kompartiment-Modell in einigen Punkten revidiert werden:

- Potentialmessungen mit Mikroelektroden (84), schnelle Potentialänderungen bei Wechsel der Natriumkonzentration in der äußeren Badelösung (50) und elektronenmikroskopische Untersuchungen mit kolloidalem Lanthanum (30) zeigten, daß die äußere Barriere unmittelbar unter dem stratum corneum lokalisiert ist.
- Untersuchungen über die Verteilung der Natrium-Kalium-stimulierbaren ATPase (32) zeigten, daß nur die den intra-

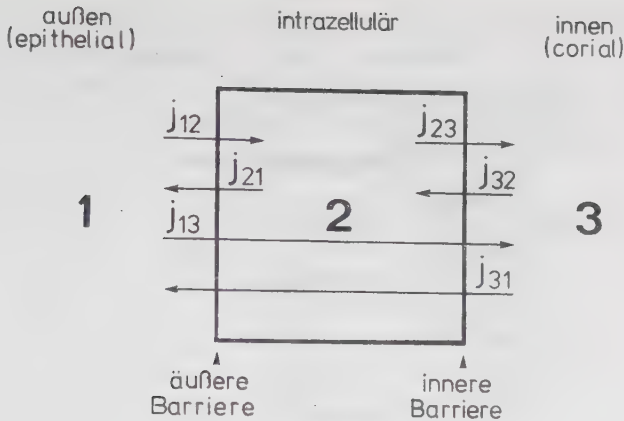


Abb. 3: Natriumflüsse in einem 3-Kompartiment-System. Der Fluß j_{nm} bezeichnet den unidirektionalen Natriumfluß von Kompartiment n nach Kompartiment m (n bzw. m = 1 2 3).

cellulären Spalten angrenzenden Zellmembranen eine ATPase-Aktivität aufweisen. Die basale Zellmembran des Stratum germinativum zeigt dagegen keine ATPase-Aktivität (s. Abb. 4).

- Die Epithelzellen der Amphibienepidermis stehen miteinander durch Interzellularbrücken in Verbindung (31).

Diese interzellularen Verbindungen zeigen eine hohe elektrische Leitfähigkeit (63), die auf eine hohe Permeabilität für niedermolekulare Elektrolyte hinweist.

- Die Zellen der Froschhautepidermis verhalten sich wie ein homogenes Kompartiment:

Das von epithelial her austauschbare Natrium ist im gesamten Epithel etwa gleich verteilt (13). Das gesamte (94%) zelluläre Kalium läßt sich von der Coriumseite her austauschen (20). Änderungen des epithelialen Zellvolumens bei Änderungen des Kaliumgehaltes im Innenbad waren bis auf das Stratum corneum in allen Zellagen gleichartig (85).

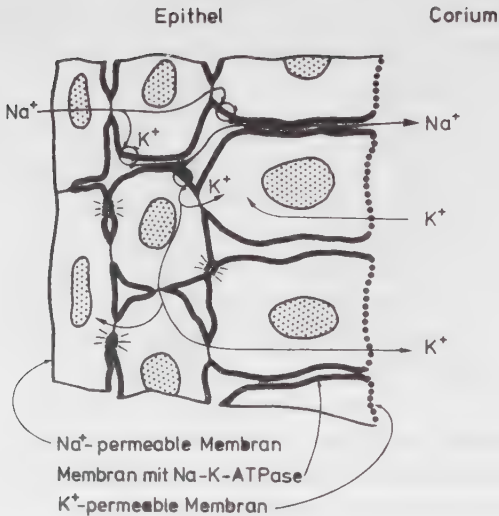


Abb. 4: Verteilung von ATPase in der Amphibienepidermis.

Nach: Farquhar, M.G., und G.E. Palade (32).

- Für den Natrium-Efflux konnte ein transepithelialer extrazellulärer "Shunt" wahrscheinlich gemacht werden (84).

Die Zusammenfassung dieser Befunde führt zu einer Präzisierung des 3-Kompartiment-Modells, wie sie in Abb. 5 dargestellt wird. 4 Punkte sind hervorzuheben:

- Die äußere Barriere für den Natriumeinstrom wird von der äußeren Zellmembran der Stratum granulosum-Zellen gebildet.
- Die Intrazellulärräume der Zellen kommunizieren über Intercellularbrücken, die für Natrium gut permeabel sind. Die Intrazellulärräume aller Zellen bilden gemeinsam das Transportkompartiment.
- Die den Intercellularspalten benachbarten Zellmembranen entsprechen der inneren Barriere, an der das Natrium aktiv

durch eine Natrium-Kalium-Pumpe in den Extrazellulärraum der corialen Seite transportiert wird.

- Der Natriumausstrom (Efflux) verläuft weitgehend extracellulär über die Interzellulärspalten.

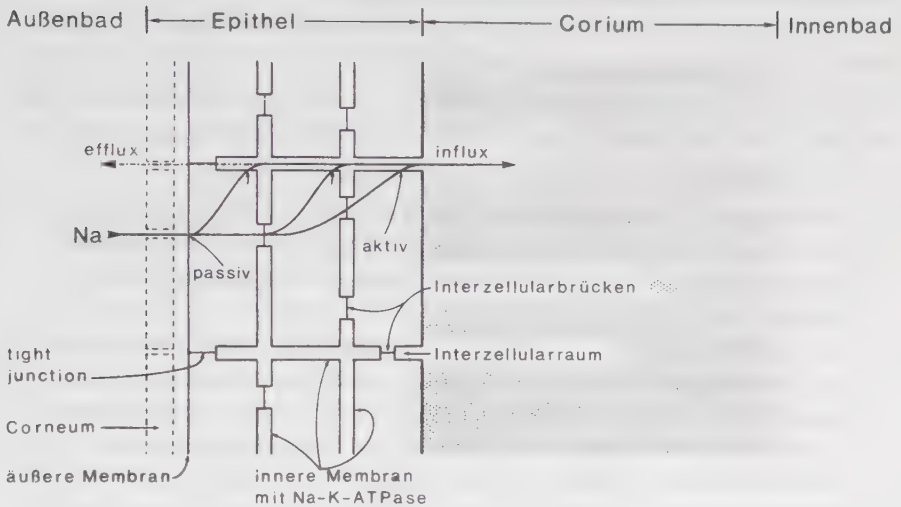


Abb. 5: Modell des transepithelialen Natriumtransportes der Froschepidermis.

Erläuterung im Text.

tight junction = Zonula occludens.

Das in Abbildung 5 dargestellte 3-Kompartiment-Modell des transepithelialen Natriumtransportes ist in den letzten Jahren teils in Einzelpunkten, teilweise jedoch auch grundsätzlich (15) in Frage gestellt worden. Der obligate Austausch von Natrium gegen Kalium durch eine 1 : 1 gekoppelte Pumpe an der inneren Barriere (Abb. 2, $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ (44)), wie

sie von der Ussing'schen Arbeitsgruppe postuliert wurde, wurde für die Froschhaut verneint (10, 20). Dies stimmt mit Befunden an anderen natriumtransportierenden Epithelien überein. Für das Epithel der Krötenblase gibt es Hinweise auf eine elektrogene Natriumpumpe (61, 38). Für das Tubulusepithel der Niere wurde die Existenz einer elektrogenen Natriumpumpe neben einer elektroneutralen Natrium-Kalium-Pumpe wahrscheinlich gemacht (88, 49).

Zwei Punkte blieben vor allen Dingen bei der Analyse des trans-epithelialen Natriumtransportes an Hand der 3-Kompartiment-Vorstellung unklar:

1. Die Menge und Konzentration des intrazellulären Natriums, das funktionell in den Transport eingeschaltet ist (Natriumtransportpool) und seine Lokalisation innerhalb der Epidermis.
2. Der passive Charakter des Natriumeinstroms über die äußere Barriere blieb fraglich (73, 11). Dies lag im Wesentlichen daran, daß eine korrekte Bestimmung des elektrochemischen Gradienten über diese Barriere bisher nicht möglich war. Experimentelle Ansätze für die direkte Messung dieses Natriumeinstroms in das zelluläre Kompartiment sind erst seit 4 Jahren vorhanden (4, 75).

Eine Kalkulation des elektrochemischen Gradienten über die äußere Barriere mit Hilfe von Daten aus der Literatur zeigt, daß der j_{12} nicht passiver Natur sein kann: Bei Annahme eines passiven Charakters der äußeren Barriere ist das Verhältnis der unimembranal Flüsse j_{12} und j_{21} durch die Aktivitäten des Natriums im Kompartiment 1 und 2 und der Potentialdifferenz über diese Membran festgelegt ("Flußgleichung"). Unter bestimmten Bedingungen erfüllen die Natriumflüsse über die äußere Barriere diese Flußgleichung nicht. Der Frosch nimmt selbst bei fast natriumfreier Umgebung (10^{-5} M) noch Natrium auf (58). Mit der chemischen Analyse wird die intrazelluläre Natriumkonzentration bei natriumfreier Außenlösung zu 40 - 50 meq/l bestimmt (73 14). Potentialmessungen zeigen, daß unter nicht

kurzgeschlossenen Bedingungen über die äußere Barriere ein positiver Potentialsprung gemessen wird (28, 45). Unter Kurzschlußbedingungen ist ein geringer negativer, den Natriumeinstrom fördernder Potentialsprung (-16 mV (12)) zu beobachten. Eine Nettoaufnahme von Natrium über die äußere Barriere aus nahezu natriumfreien äußeren Badelösungen läßt sich auf Grund dieser Daten nicht erklären: Der kalkulierte elektrochemische Gradient ist entgegengerichtet.

Drei Erklärungsmöglichkeiten für die dennoch beobachtete Nettoresorption (58) lassen sich angeben:

1. Ein aktiver Aufnahmeschritt von Natrium über die äußere Barriere würde eine Resorption ermöglichen. Die für einen aktiven Aufnahmeschritt notwendige ATPase - unter der Annahme, daß nur maximal 3 Natriumionen pro ATP-Hydrolyse transportiert werden (78) - ist an der äußeren Barriere allerdings nicht vorhanden (73, 32). Das relativ schwierige Bestimmungsverfahren läßt jedoch Zweifel an dieser Aussage zu.
2. Der passive Einstrom von Natrium in die Zellen wäre möglich, wenn die wirksame Natriumkonzentration im Transportkompartiment wesentlich niedriger läge, als sie mit der chemischen Analyse bestimmt wird. Mit der Elektronenstrahlmikrosonde lassen sich seit Kurzem intrazelluläre Natriumkonzentrationen direkt bestimmen. Die mit diesem Verfahren bestimmten Konzentrationen liegen weit unter denen, die mit der chemischen Analyse bisher ermittelt wurden (25). Die Werte in der chemischen Analyse lassen sich zum Teil auf eine Fehlbestimmung des ECR (Extrazellulärraum) bei Verwendung von Inulin als ECR-Marker zurückführen. Dadurch wird extrazellulär gelegenes Natrium dem ICR (Intrazellulärraum) zugeschlagen. Besser diffusible ECR-Marker zeigen auch größere Werte für den ECR der isolierten Froschhaut (10). Studien über das mit Tracern (Na-24 , Na-22) austauschbare Natrium der Froschhaut (14, 13, 61) und die kinetische Analyse des transepithelialen Natriumtransportes (46) zei-

gen eine Kompartimentisierung des gesamten Natriums der Froschhaut (siehe Abb. 6) in:

- gebundenes, nicht austauschbares Natrium
- von Corium her austauschbares Natrium, $*Na_{cor}$ (= "ENTC", nicht transportierendes austauschbares Natrium (14))
- von außen (epithelial) her austauschbares Natrium, $*Na_{epi}$ (= Transportpool (37)).

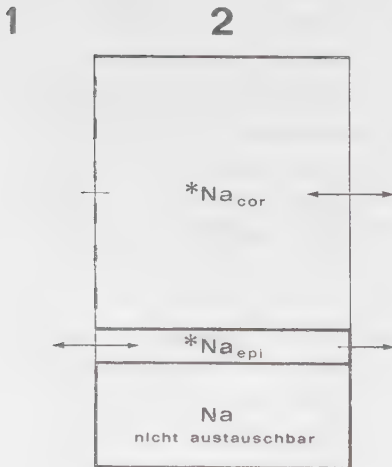


Abb. 6: Kompartimentierung des intracellulären Natriums der Froschhaut. Erläuterung im Text.

Unter der Annahme, daß das von außen austauschbare Natrium gleichmäßig auf den gesamten ICR der Epidermis verteilt ist (73), ergeben sich intracelluläre Konzentrationen an Transportnatrium von 8 bis 20 meq/l (14, 23). Bestimmungen am isolierten Epithel der Froschhaut zeigen noch niedrigere Werte: 3 meq/l equilibrieren mit der äußeren Badelösung (Transportpool), 24 meq/l ist die intrazelluläre Gesamtkonzentration an Natrium (1, 30).

Bestimmungen des Aktivitätskoeffizienten von Ionen in biologischen Geweben (49) und Untersuchungen mit Hilfe der Kernresonanz (74, 18) weisen darauf hin, daß nur ein Teil der Elektrolyte in freier Form vorliegt.

3. Als 3. Möglichkeit schlugen Cereijido und Rotunno (15) ein Modell vor, bei dem das Natrium bei der Permeation durch die Haut den ICR nicht passiert (Abb. 7). Das von epithelial her austauschbare Natrium (Transportpool) verhält sich zum Teil so, als sei es bereits transportiert (91), was die Annahme nahelegt, es gäbe keinen funktionellen Transportpool (= Natrium im Kompartiment 2, vor dem entscheidenden aktiven Transportschritt), oder dieser Pool sei sehr klein. Die Befunde an isolierten Epithelien, bei denen sehr kleine Transportpoolgrößen (9 neq/cm^2 (1)) bestimmt wurden, stützten diese Annahme.

Die Differenzierung dieser 3 Möglichkeiten erfordert eine korrekte Bestimmung des wirklichen elektrochemischen Gradienten über die äußere Barriere. Die Frage nach der Natur des j_{12} und damit auch nach dem funktionellen Charakter des Transportpools könnte jedoch auch durch die direkte Messung des Natriumeinstroms in die Haut (j_{12}) entschieden werden.

Cereijido und Rotunno (16, et al. 75) und Biber et al. (7, 5, 6) haben zwei unterschiedliche Verfahren angegeben, mit denen sich der j_{12} direkt bestimmen läßt. Nach Biber (7, 6) teilt sich der j_{12} in eine lineare Komponente (die eine Proportionalität zur Natriumkonzentration in der äußeren Badelösung aufweist) und eine Sättigungskomponente auf. Nach Elimination der linearen Komponente erhält Biber einen j_{12} , der noch 50% über dem SCC liegt, was einem Verhältnis von j_{12} und j_{21} von 3 : 1 entspricht. Die gemessene lineare Komponente, die einem zusätzlichen Austausch von Natrium über die äußere Barriere entsprechen würde, zeigte eine Abhängigkeit von dem verwendeten ECR-Marker (7, 29). Sie ist daher möglicherweise auf Fehler in der ECR-Bestimmung zurückzuführen.

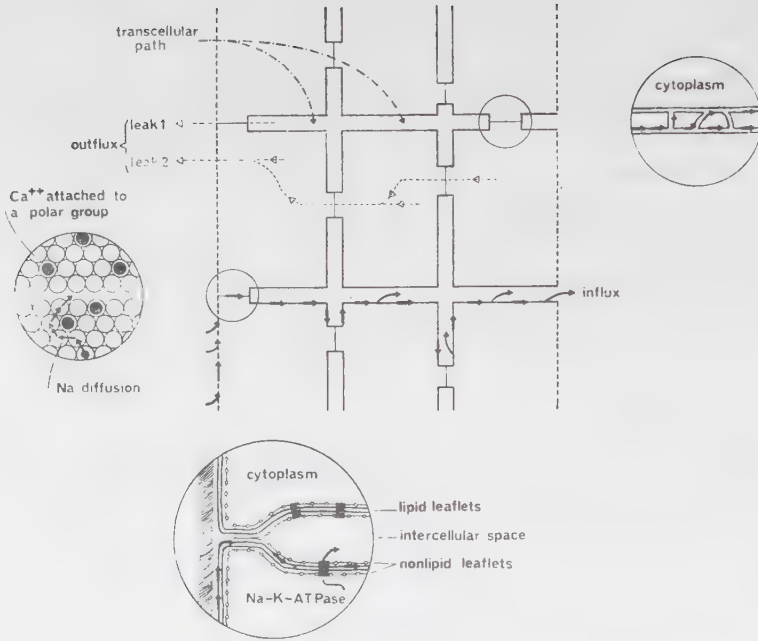


Abb. 7: Modell des transepithelialen membranalen Natriumtransportes.

Aus: Cereijido, M., und C.A. Rotunno (15).

Mit der von Cereijido et al. (75 16) angegebenen Methode wurden bisher sehr große Austauschflüsse an der äußeren Barriere gemessen (bei isotoner Froschringerlösung). Nach einer Modifizierung der Bestimmungsmethode konnte jedoch eine ungefähre Identität zwischen j_{13} und j_{12} beobachtet werden (65).

Neben diesen direkten Ansätzen sind die Natriumflüsse an der äußeren Barriere auch mit indirekten Bestimmungsverfahren er-

mittelt worden, die auf einer kinetischen Analyse der trans-epithelialen Natriumflüsse beruht. Der j_{12} wurde mit $2,5 - 3,0 \mu\text{eq}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$ und der j_{21} mit $1,1 - 1,6 \mu\text{eq}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$ unter Kontrollbedingungen (Kurzschlußfall) angegeben (19).

Ein weiteres Verfahren zur Quantifizierung der Natriumflüsse über die äußere Barriere wurde von Nagel und Dörge (24) angegeben. Beim Auswasch der von epithelial her mit Tracer aufgeladenen Haut nach beiden Seiten ergibt sich ein Verhältnis von j_{23} und j_{21} von ca. $20 : 1$. Daraus läßt sich ein j_{21} errechnen, der nur etwa 4% des SCC beträgt. Der errechnete j_{21} entspricht jedoch nur dem Anteil des j_{21} , der aus dem mit Tracern markierten Anteil des Kompartment 2 (vergl. Abb. 3 und 5) stammt. Der gesamte j_{21} kann daher jedoch wesentlich größer sein.

III) METHODE

1. Biologisches Objekt und seine Präparation

Die vorliegenden Untersuchungen wurden an der isolierten Bauchhaut von europäischen Fröschen beiderlei Geschlechts der Arten *Rana temporaria* und *Rana esculenta* durchgeführt. Die Frösche wurden in den Monaten März bis Oktober 1972 gefangen und bis zu ihrer Verwendung in Plastikbecken mit fließendem Leitungswasser bei Zimmertemperatur gehalten (maximal 4 Wochen). Während dieser Zeit wurden die Tiere nicht gefüttert.

Für die Versuche wurden die Tiere nach Größe und einwandfreier Beschaffenheit ihrer Bauchhaut ausgesucht. Die Frösche wurden dekapitiert und ihr Rückenmark mit einer Sonde zerstört. Danach wurde die Bauchhaut der Frösche mit Schere und Pinzette abpräpariert, wobei sorgfältig darauf geachtet wurde, daß keine Schnitt- oder Quetschverletzungen der Haut auftraten. Die so isolierten Häute wurden dann in die Rahmen (Abb. 10), mit denen sie in die Doppelkammer eingebracht werden konnten, eingespannt. Bei Doppelversuchen wurden links-rechts-symmetrische Teile jeweils eines Frosches verwendet.

Isolierte Epithelien

Neben den Untersuchungen an der Gesamthaut wurden auch Untersuchungen am isolierten Epithel der Froschhaut durchgeführt. Die Methode, die zur Entfernung des Coriums vom Epithel verwendet wurde, basiert auf den Angaben von Hoshiko (69) und soll im Folgenden kurz beschrieben werden:

Durch die Einwirkung von Trypsin wird das Epithel von dem Corium in Höhe der Basalmembran von einander getrennt. Um die Einwirkung von Trypsin zu beschleunigen, wurde die abpräparierte Froschhaut coriumseitig auf einer Fläche von 1,5 x 5 cm mit einem engmaschigen Netz von oberflächlichen Schnitten versehen. Der Abstand der Schnitte, die mit einem Skalpell ausgeführt wurden, betrug etwa 1 mm. An-

schließlich wurde die Haut über ein Becherglas gespannt, wobei die Epithelseite in normaler Froschringer, die Coriumseite in Trypsin-Ringer (50 mg%) badete (Abb. 8 links).

Nach 40 min Inkubationszeit wurde die Haut mit Ringer gründlich abgespült und mit dem Corium nach oben auf einen Paraffinblock gespannt (Abb. 8 rechts). Unter Sichtkontrolle durch ein Stereomikroskop wurde das Corium in dem aufgeritzten Gebiet mit Mikroschere und Pinzette entfernt. Um ein Austrocknen des Epithels zu verhindern, wurde die gesamte Präparation der Haut in Ringerlösung durchgeführt. Nur einwandfreie Epithelien wurden in die Rahmen eingespannt.

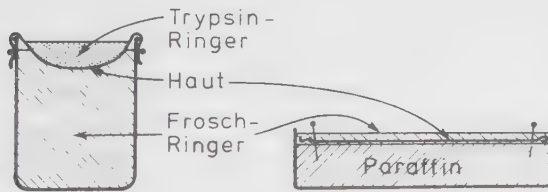


Abb. 8: Präparation der isolierten Epithelien.

Links: Trypsininkubation, Coriumseite der Haut oben.

Rechts: Auf dem Paraffinblock ausgespannte Froschhaut.

2. Versuchsanordnung

(Übersicht auf Bild 9)

Die Versuchsanordnung bestand im Wesentlichen aus einer Kammer, in die die in einem Rahmen eingespannte Haut eingelegt wurde. Die beiden Seiten der Haut wurden so von voneinander getrennten Lösungen gespült. Mit einem Kurzschlußautomaten wurden die elektrischen Funktionsparameter des Natriumtransportes der Haut (Potential, SCC) kontinuierlich gemessen. Eine Infusions- und Absaugevorrichtung erlaubte einen schnellen Wechsel der Badelösungen und eine synchrone Beschickung der beiden Kammerhälften mit Testlösungen.

Im Folgenden werden die wesentlichen Teile der Versuchsanordnung besprochen.

2.1. Rahmen

Der Rahmen, in dem die isolierte Froschhaut eingelegt wurde, besteht aus zwei Teilen (Abb. 10 rechts).

Die beiden Hälften sind so aufeinander abgepaßt, daß die Haut im Rahmen etwas gequetscht und dabei die ausgestellte Hautfläche ähnlich dem Fell einer Trommel gleichmäßig gespannt wurde. Die ausgestellte Hautfläche beträgt 1,5 x 5 cm.

Um Randeffekte zu vermeiden, die durch Quetschung der Haut auftreten (41), wurde an einer Rahmenhälfte die Fläche, die am Rand der ausgestellten Haut mit der Haut in Berührung steht, abgeschrägt (Abb. 10 links oben).

2.2. Flutkammer

Die Flutkammer aus Plexiglas besteht aus zwei gleichen Kammerhälften (Abb. 11 grau gekennzeichnet, Abb. 12 i, j).

Durch Einlegen des Rahmens (a), in dem die Froschhaut (b) eingespannt ist, wird die Kammer in zwei Hälften mit je einem Füllvolumen von 9 ml geteilt. Zwischen beiden Kammer-

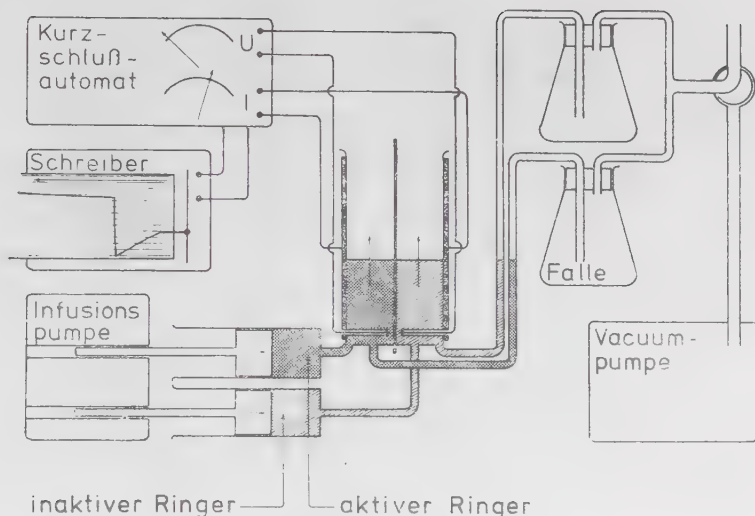


Abb. 9: Schema der Versuchsanordnung.

Vereinfachte Übersicht.

Anordnung während der Infusion der Testlösungen (Fluten). In der Mitte ist die Flutkammer dargestellt (die epitheliale Kammerhälfte links). Der mittlere senkrechte Strich symbolisiert die in den Rahmen eingespannte Haut.

hälften und dem Rahmen befinden sich Dichtungen aus PVC (1 mm dick) (g). Zur Messung des Kurzschlußstromes sind in der Rückwand der beiden Halbkammern 8 cm^2 große chlorierte 2 mm dicke Silberplatten eingelassen (e). Der Übergangswiderstand dieser Stromelektrode beträgt $240 \Omega \times \text{cm}^2$. Die Ringerbrücken (d) zu den Potentialelektroden sind herausnehmbar und so justierbar, daß ihre freie Öffnung sich 1 mm von der Haut und 2 mm oberhalb des Kammerbodens befindet. In den beiden Kammerhälften sind je zwei Bohrungen

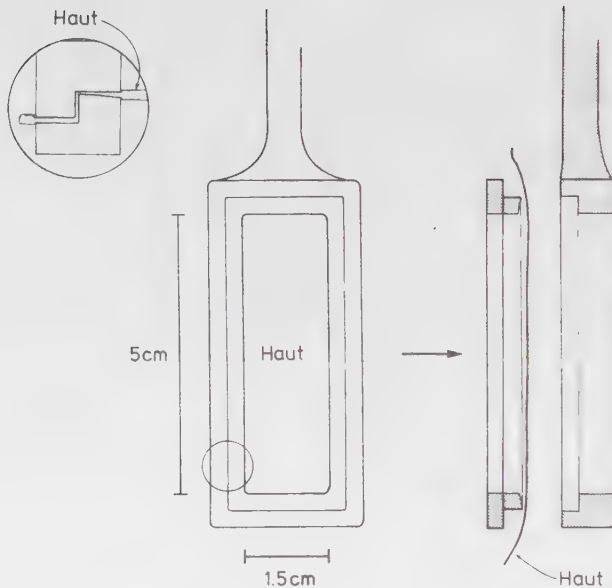


Abb. 10: Rahmen.

Links Aufsicht, rechts Querschnitt durch beide Rahmenhälften (auseinandergenommen).

Zum Einspannen der Haut werden die Rahmenhälften in Pfeilrichtung ineinandergesteckt.

Im Vergrößerungsausschnitt links oben: Quetschung der Haut im Rahmen (Querschnitt).

(e) eingelassen, über die in die beiden Kammerhälften vom Kammerboden her getrennt Flüssigkeiten injiziert und abgesaugt werden können. Ebenso können durch diese Bohrungen die Kammerhälften getrennt mit Luft durchperlt werden, um die Haut mit Sauerstoff zu versorgen. Um den Rahmen mit der Haut aus der Flutkammer schnell herausnehmen zu kön-

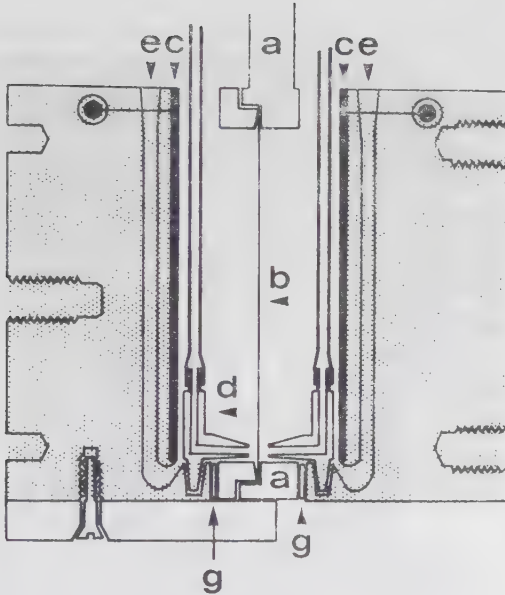


Abb. 11: Längsschnitt durch die Flutkammer in der Mittelebene.

Die vier Bohrungen für das Beschicken der Kammerhälften (e) liegen je einmal vor und hinter der Mittelebene. Bezeichnungen sind im Text erläutert.

nen, sind die beiden Kammerhälften an einer speziellen Vorrichtung befestigt (Abb. 12). Die rechte (coriale) Kammerhälfte (j) ist an einer Achse befestigt, die beweglich gelagert ist. Mit einem Gestänge konnte die coriale Halbkammer (j) vor und zurück bewegt werden. Die epitheliale Kammerhälfte (i) war dagegen fest montiert. Abbildung 12 zeigt die Anordnung während des Versuches, bei der das Gestänge die coriale Kammerhälfte über Gummipuffer federnd an den Rahmen preßt und somit die Flutkammer abdichtet. Der Anpressdruck konnte durch die verschiebbare Arretierung des Hebels bestimmt werden.

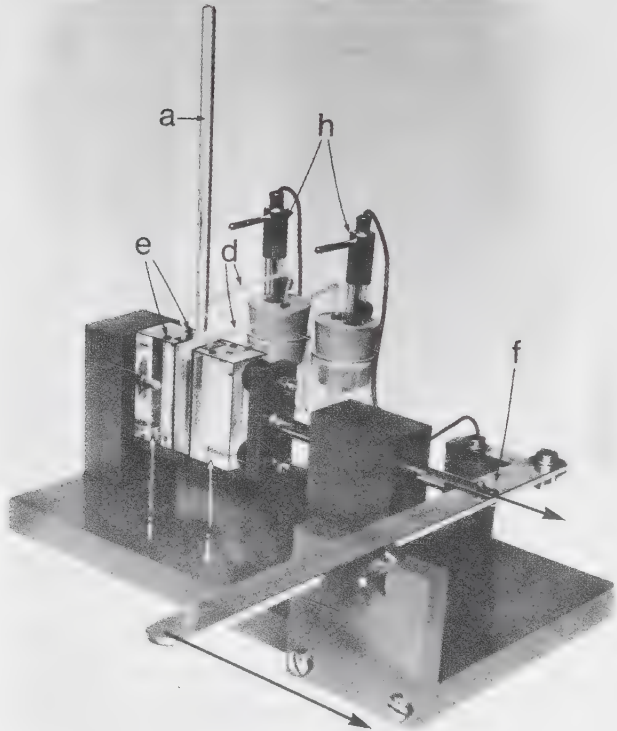


Abb. 12: Flutkammer (i, j) und Rahmen (a) in der Halte-
vorrichtung.

(h) Kalomelelektroden.

Weitere Erläuterung im Text.

Nach dem Versuch wurde die Arretierung gelöst, der Hebel in Pfeilrichtung bewegt und dadurch der Rahmen (a) freigegeben. Beide Kammerhälften waren zur Säuberung leicht abschraubbar.

2.3. Messung der elektrischen Parameter

Das Froschhautpotential wurde mit zwei Kalomelelektroden (h) der Firma Puschl und einem mV-Meter mit hoher Impedanz ($10^9 \Omega$) bestimmt. Die Verbindung von den Elektroden zu der Flüssigkeit der beiden Kammerhälften wurde durch Agar-Ringer-Brücken (d) hergestellt. Die Differenz der Eigenpotentiale der Elektroden wurde vor jedem Versuch bestimmt und betrug weniger als 1 mV. Mit Ausnahme einer Versuchsreihe wurde bei allen Versuchen das Potential der Haut kurzgeschlossen. Der zur Kompensation auf Null notwendige Gegenstrom wurde von einer elektronischen Schaltung automatisch geliefert (36). Der Fehler in der Bestimmung des Kurzschlußstromes, der durch eine Differenz der Eigenpotentiale der Spannungselektroden auftreten würde, konnte mit der elektronischen Schaltung eliminiert werden. Auf Grund der kleinen Zeitkonstante des Automaten (im Millisekundenbereich) wurden schnelle Änderungen des SCC verzerrungsfrei wiedergegeben. Die nächste Abbildung zeigt das Schaltbild dieses Kurzschlußautomaten.

Der gemessene Kurzschlußstrom (SCC) wurde fortlaufend auf einem Kompensationsschreiber der Firma Metrawatt (Servogor, 2-Kanal) geschrieben.

2.4. Infusions- und Absaugvorrichtung

(Schematische Wiedergabe in Abb. 9)

Die Testlösungen wurden mit einer Doppelinfusionspumpe (Eigenbau) getrennt in beide Kammerhälften injiziert. Die Infusionsgeschwindigkeit konnte zwischen 9 ml/30 sec und 9 ml/360 sec variiert werden. Zur schnellen Entleerung wurden die Kammerinhalte mit Hilfe einer Vakuumpumpe (VacUUbrand)

abgesaugt. Die vollständige Entleerung der Kammer dauerte weniger als 2 sec. Die Lösungen der Kammerhälften wurden in getrennten Fällen aufgefangen. Die benutzten, radioaktiv-markierten Lösungen konnten somit mehrfach verwendet werden.

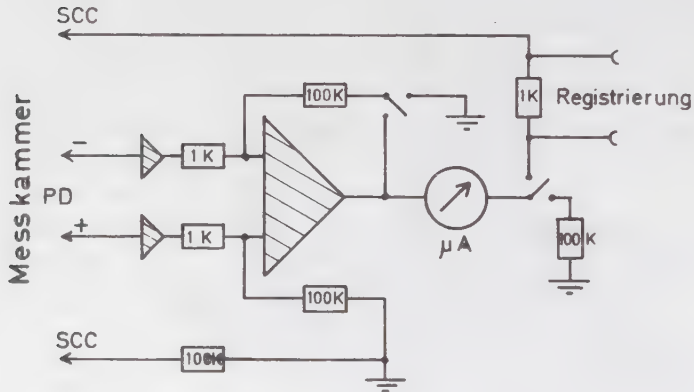


Abb. 13: Schaltbild des Kurzschlußautomaten zur Bestimmung von Membranpotential und Kurzschlußstrom. Bei dem Operationsverstärker handelt es sich um die Type LH 101 der National Semiconductor.

3. Lösungen

In der folgenden Tabelle ist die Zusammensetzung der verwendeten Lösungen angegeben:

Tabelle 1: Verwendete Lösungen. Konzentrationsangaben in meq/l

Bezeichnung	Na ⁺	Cholin ⁺	K ⁺	Ca ⁺⁺	Cl ⁻	HCO ₃ ⁻
Ringer	110.0	0.0	2.5	2.0	112.0	2.5
10er-Ringer	10.0	100.0	2.5	2.0	112.0	2.5
1er-Ringer	1.0	109.0	2.5	2.0	112.0	2.5
0er-Ringer	0.0	110.0	2.5	2.0	112.0	2.5

Trypsin-Ringer enthielt 500 mg/l Trypure Novo^R.

Amilorid (N-amidino-3-amino-6-chloropyrazincarboxamid) und g-Strophantin (Merck) wurden in 10⁻⁴ M Konzentration verwendet. Die radioaktiven Lösungen enthielten 50 - 500 µc Na-24/ml (Forschungsreaktor Garching).

Die Lösungen auf beiden Seiten der Haut waren hinsichtlich ihrer Elektrolytzusammensetzung immer identisch. Auf diese Weise wurden Konzentrationsgradienten über die Haut vermieden. Die Lösungen hatten eine Osmolarität von 215 mOsmol/l und wiesen bei Durchperlen der Luft einen pH von 8,2 - 8,4 auf.

4. Versuchsdurchführung

Vor jedem Versuch wurde die Differenz der Eigenpotentiale der Spannungselektroden (Kalomelektroden mit den Ringerbrücken) bestimmt (< 1 mV) und ihre Stabilität kontrolliert. Der interne Nullpunkt des Kurzschlußautomaten wurde auf dieses Differenzpotential eingestellt, so daß sowohl bei der Nullklemmung als auch bei der Potentialmessung (open circuit) die Differenz der Elektrodenpotentiale eliminiert war. Der Rahmen mit der eingespannten isolierten Froschhaut wurde dann in die Flutkammer eingelegt (Abb. 12).

4.1. Vorlauf

Beide Kammerhälften wurden zunächst mit normalem Frosch-Ringer gefüllt und mit Luft durchperlt.

Die spontan auftretende PD (Potentialdifferenz) der Haut wurde bestimmt und dann die Kurzschlußstromkompensation eingeschaltet. Zwischenzeitlich wurde die Kompensation immer wieder unterbrochen und die PD erneut bestimmt. Die Badelösungen wurden in regelmäßigen Abständen (10 min) durch neue Ringerlösung ersetzt. Dieser Vorlauf dauerte im allgemeinen eine halbe bis dreiviertel Stunde, bis SCC-Schreibung und PD anzeigten, daß sich die Haut im steady state befand (weniger als 0,5% Änderung pro min). Der steady state-SCC wird als Kontrollwert bezeichnet. Wenn die Häute einen stabilen SCC-Wert nicht erreichten, wurde das Experiment nicht weiter fortgesetzt. Die Größe des Kontroll-SCC war im allgemeinen kein Auswahlkriterium, da nur Häute mit Kurzschlußleistungen $< 10 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ verworfen wurden. Nach dem Vorlauf wurden die Bedingungen den einzelnen Versuchsserien entsprechend geändert:

Normalbedingungen

Bei den Versuchen mit Normalbedingungen (= Kontrollversuche) wurde die j_{12} -Bestimmung mit dem Fluten der Haut unmittelbar an den Vorlauf angeschlossen. Die Testlösungen beim Fluten entsprachen auf beiden Seiten normalen (110er)

Ringer, wobei das Natrium der epithelialen Testlösung mit dem Na-24-Isotop markiert war (Kurzbezeichnung: 110*/110).

Open circuit-Versuche (= Versuche im nicht kurzgeschlossenen Zustand)

Die Kammerhälften wurden entleert. Durch erneute Injektion von normalem Ringer wurde der SCC-Verlauf beim Fluten (s. 6.4.3.) ermittelt. Die SCC-Schreibung in diesem Probelauf ermöglichte eine Information über eine etwaige Inhomogenität der Haut bezüglich ihrer örtlichen Transportleistungen (s. 6.5.1.). Nach dem Probelauf wurde die Kurzschlußkompensation ausgeschaltet (open circuit). Nach entweder 1 min oder 15 min im open circuit wurden die Lösungen abgesaugt und durch erneutes Fluten mit den Testlösungen (110*/110) die j_{12} -Bestimmung im nicht kurzgeschlossenen Zustand durchgeführt.

Wärme-Kälte-Versuche

Die Versuche wurden als Paarversuche an seitensymmetrisch gleichen Stücken derselben Haut durchgeführt. Es wurde gewartet, bis sich die Froschhauthälfte in der Kältekammer bezüglich ihres SCC im steady state befand (ca. 2 h).
Testlösungen: 110*/110.

Amilorid-Versuche

Der Inhalt der epithelialen Kammerhälfte wurde gegen amiloridhaltigen (10^{-4} M) Frosch-Ringer ausgetauscht. Die maximale Inhibition des SCC wurde abgewartet. Darüberhinaus wurde weitere 20 min inkubiert, um mögliche intrazelluläre Konzentrationsänderungen mit zu berücksichtigen (67). Die Testlösungen beim Fluten enthielten Amilorid 10^{-4} M oder 10^{-3} M (110* + Amilorid/110).

Strophantin-Versuche

Der Inhalt der corialen Kammerhälfte wurde gegen g-strophantinhaltigen (10^{-4} M) Ringer ausgetauscht. Der volle Effekt auf den SCC wurde abgewartet. Um bezüglich der intrazellulären Elektrolytkonzentration (68) im Gleichgewicht zu sein, wurde die j_{12} -Bestimmung erst nach 60 - 90

min durchgeführt.

Testlösungen: $110^*/110$ + Ouabain.

Versuche mit niedrigen Natriumkonzentrationen

Nach dem Vorlauf wurden die Badelösungen gegen 10er-Ringer ausgetauscht. Nach 20 - 40 min Inkubation wurde die j_{12} -Bestimmung mit $(10^*/10)$ durchgeführt. Nach dieser Zeit sind die intrazellulären Elektrolytkonzentrationen bereits in einem neuen Gleichgewicht (22).

Versuche mit Konzentrationssprung

Zur Ermittlung des SCC-Verlaufs wurde ein Probelauf (s.o.) durchgeführt, anschließend wurden die Badelösungen beider Kammerhälften gegen Ringerlösungen mit niedriger Natriumkonzentration (0er-Ringer, 1er-Ringer oder 10er-Ringer) ausgetauscht. Dieser Austausch wurde mehrfach wiederholt. Die Inkubation in natriumarmer bzw. natriumfreier Lösung wurde ca. 90 min durchgeführt, um das neue steady state der intrazellulären Elektrolytkonzentrationen und des SCC abzuwarten.

Testlösungen: $110^*/110$.

In einigen Versuchen enthielt die epitheliale Testlösung zusätzlich Amilorid (10^{-4} M, 10^{-3} M).

4.2. Fluten

(Übersicht auf Abb. 9)

Die Vorlauf- oder Inkubationslösungen wurden aus beiden Kammerhälften gleichzeitig innerhalb einer Sekunde abgesaugt. Die Zuleitungsschläuche zur Infusionspumpe wurden angeschlossen. Nach dem Einschalten der Pumpe erscheint mit einer Latenz von 1 sec die erste Flüssigkeit aus der Kammer (= Flutbeginn). Zwischen Absaugen und Flutbeginn vergingen etwa 5 sec, in dieser Zeit war die Haut nicht kurzgeschlossen. Während des Flutens wurden die Kammerhälften nicht von Luft durchperlt, so daß die Flüssigkeitsspiegel glatt waren. Mit Ausnahme der open circuit-Versuche war die Haut beim Flutvorgang kurzgeschlossen. Nach Errei-

chen des oberen Kammerrandes (oberer Rand der ausgestellten Hautfläche) wurden die Lösungen schlagartig abgesaugt und in getrennten Fällen (Abb. 9) aufgefangen. Die Flutkammerhälften wurden auseinandergerissen (Abb. 12) und der Rahmen mit der Haut herausgenommen. Die Epithelseite der Haut wurde dann sofort mit isotoner Sucroselösung 1 - 2 sec lang abgespritzt (s. 6.4.1.). Der gesamte Vorgang am Ende des Flutens bis zum Abspritzen nahm etwa 2 sec in Anspruch. Die Haut wurde anschließend mit dem Corium nach unten auf einen Bock gelegt und mit Schneideblöcken in 9 bzw. 18 gleichgroße Stücke zerteilt (Abb. 15). Um eine Versmierung der aufgenommenen Tracermenge durch Querdiffusion zu vermeiden, wurden die Teilstücke sofort voneinander getrennt. Zwischen Abspritzen und Isolierung der Hautstücke verstrichen 3 - 5 sec.

5. Auswertung

Die Hautstücke wurden in Zähl-Reagenzgläser verbracht und ihre Zählraten in einem γ -Zähler (ICN Tracerlab, gamma/guard 150 mit spectromatic) bestimmt. Den aktiven Testlösungen wurden Proben entnommen und 2000-fach verdünnt. Jeweils 1 ml dieser Verdünnung (0,5 μ l der Testlösung, entsprechend 55 neq ^{22}Na bei 110er-Ringer) ergaben den Standard. Standard und Hautstücke hatten beim Zählen gleiche geometrische Anordnung zum Detektor. In einem Versuchsprotokoll wurden folgende Meßwerte festgehalten:

- Zählraten der Hautstücke (C_S), des Standards und des Untergrunds;
- PD und SCC im Vorlauf (Kontrollwert) und in der Inkubationsphase (mit Angabe der unterschiedlichen Bedingungen);
- SCC-Schreibung während des Flutens;
- die Flutzeit t_G (vom Flutbeginn bis zum Absaugen);
- die Basiszeit t_B (vom Absaugen bis zum Abspritzen der Haut);
- die Fläche der ausgestanzten Hautstücke.

Aus diesen Daten und konstanten Größen (ausgestellter Hautfläche, Kammerhöhe, Umrechnungsfaktoren) wurden mit Hilfe von Rechenprogrammen (Olivetti Bürocomputer P 203) die Ergebnisdaten kalkuliert. Flußgrößen (SCC, j_{12} , j_{21} , j_{31}) und Leitfähigkeit der Haut wurden jeweils pro 1 cm² gerechnet. Der Hautwiderstand wurde als $R = \text{PD}/\text{SCC}$ gerechnet und entspricht damit dem scheinbaren Gleichstromwiderstand (lineare I/U-Relation vorausgesetzt).

Die Grundlagen der j_{12} -, j_{21} - und $^{22}\text{Na}_{\text{ECR}}$ -Ermittlung werden bei 6.4.2., 6.4.3. und 6.5.2. besprochen.

5.1. Statistik

Die Zusammenstellung und der Vergleich von Ergebnissen aus verschiedenen Versuchen erfolgte nach den Regeln der Statistik (56, 35, 42).

Es wurden folgende Größen verwendet:

a) Mittelwert, $\bar{x}$

$$\bar{x} = \frac{\sum x}{n}$$

b) Standardabweichung der Einzelmessung SD

$$SD = \sqrt{\frac{\sum x^2 - \bar{x} \cdot \sum x}{n - 1}}$$

c) Standardfehler des Mittelwertes, SEM

$$SEM = \frac{SD}{\sqrt{n}}$$

d) Signifikanz der Differenz zweier Mittelwerte, P
- für nicht verbundene Messungen mit der Testgröße

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{\frac{(n_1-1) \cdot SD_1^2 + (n_2-1) \cdot SD_2^2}{n_1 + n_2 - 2} \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)}}$$

und dem Freiheitsgrad $\nu = n_1 + n_2 - 2$

- für verbundene Messungen mit der Testgröße

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{SD_D} \sqrt{n - 1}$$

wobei SD_D die Standardabweichung der Differenz der verbundenen Einzelmessungen ist,
und dem Freiheitsgrad $\nu = n - 1$.

Mit der so berechneten Testgröße t und dem Freiheitsgrad ν wurden in den Tafeln der Studentischen t -Verteilung die einseitige Irrtumswahrscheinlichkeit P (= Integral von ∞ bis t) abgelesen.

e) Lineare Regression, $y = ax + b$

$$a = \frac{\sum xy - n \cdot \bar{x} \bar{y}}{\sum x^2 - n \cdot \bar{x}^2}$$

$$b = \bar{y} - a \bar{x}$$

Die statistische Analyse wurde mit Hilfe eines Olivetti Bürocomputer P 203 durchgeführt.

Verteilungsanalysen (Histogramme) der Meßreihen ergaben Verteilungen mit in etwa normalverteilter Charakteristik.

6. Theorie der Methode

6.1. Allgemeine Ableitung der j_{12} -Bestimmung

Der Natriumeinstrom aus der epithelialen Badelösung in die Haut (j_{12}) kann ebenso wie die unidirektionalen transepithelialen Natriumflüsse (j_{13} , j_{31}) mit Hilfe von Radioisotopen bestimmt werden. Aus der von der Haut aufgenommenen Radioaktivität, C_2 (cpm/cm²), und der spezifischen Aktivität des Natriums im Kompartiment 1, p_1 (cpm/neq Na'), läßt sich das aus der epithelialen Badelösung stammende Natrium der Haut, $^*Na_{Epi}$ (neq/cm²), ermitteln:

$$^*Na_{Epi} = C_2 : p_1 \quad (1)$$

Bringt man die äußere Oberfläche der Haut mit einer natrium-tracerhaltigen Lösung in Kontakt, so zeigt sich mit der Zeit eine Zunahme der Radioaktivität in der Haut (ΔC_2).

Unter der Voraussetzung, daß aufgenommenes Tracer-Natrium während der gesamten Versuchszeit weder an das Kompartiment 3 abgegeben worden ist, noch in das Kompartiment 1 zurückgeströmt ist, läßt sich aus dem Tracereinstrom (dC_2/dt) der Natriumeinstrom über die äußere Barriere j_{12} berechnen.

Innerhalb kurzer Versuchszeiten ist die erste Voraussetzung gegeben: Bei der j_{13} -Bestimmung erscheint das Tracer-Natrium aus Kompartiment 1 erst nach einer Latenzzeit von 1 min im Kompartiment 3. Die Erfüllung beider Voraussetzungen innerhalb kurzer Versuchszeiten läßt sich aus den bisher in der Literatur angegebenen Daten über den j_{13} und das von der Epithelseite her austauschbare Natrium der Haut ("Transportpool") in einer 3-Kompartiment-Analyse (s.a. 77) theoretisch ableiten. Die Ableitung beruht auf der Annahme eines homogenen Verteilungsraumes des Natriums im Transportkompartiment (= 2) und darauf, daß das von epithelial her austauschbare Natrium im Wesentlichen nur Natrium im Transportkompartiment umfaßt.

Bei langen Kontaktzeiten erreicht das von epithelial her markierbare Natrium in der Haut ($*Na_{Epi}$) ein steady state. Die Haut nimmt genau soviel Tracer auf, wie sie nach beiden Seiten wieder verliert:

$$\frac{dC_2}{dt} = j_{12} \cdot P_1 - (j_{21} + j_{23}) P_2 = 0 \quad (2)$$

(P_n = spezifische Aktivität in Kompartment n)

Dieses maximal von der Epithelseite her austauschbare Natrium, $*Na_{Epi} = C_2(max) : P_1$, wird als Transportpool ("active sodium transportpool" (37)) bezeichnet. Aus flux-build-up-Experimenten des unidirektionalen influx (j_{13}) läßt sich das Zeitverhalten von P_2 bestimmen, da

$$\frac{dC_3}{dt} = j_{23} \cdot P_2 \quad \left. \vphantom{\frac{dC_3}{dt}} \right\} \dot{C}_3 = j_{23} \cdot \dot{P}_2 \quad (3)$$

Der Aufbau der spezifischen Aktivität in Kompartment 2, P_2 , zeigt somit dieselbe Zeitabhängigkeit wie der Flußaufbau des j_{13} . Die einfache Aufladeparakteristik hat eine Halbwertszeit von 2 - 5 min (46).

Innerhalb kurzer Versuchszeiten (50 sec) gilt daher:

$$(j_{21} + j_{23}) P_2 \ll j_{12} \cdot P_1$$

Die Voraussetzung für die Bestimmung des j_{12} aus der Traceraufnahme ist somit erfüllt, da $(j_{21} + j_{23})P_2$, d.h. die Tracerflüsse aus Kompartment 2, bei der kurzen Versuchsdauer gegenüber dem Einstrom vernachlässigbar klein sind. Gleichung (2) vereinfacht sich daher zu:

$$\frac{dC_2}{dt} = j_{12} \cdot P_1 = \text{konst.} \quad (4)$$

Im steady state, in dem j_{12} und P_1 konstant sind, muß sich also eine mit der Zeit lineare Traceraufnahme ergeben. Wird im Experiment eine Nichtlinearität der Natriumaufnahme mit der Zeit beobachtet, so deutet das darauf hin, daß der

zweite Term in Gleichung (2) nicht unbedeutend klein sein kann. Eine Bestimmung des j_{12} aus der Zunahme der Traceraufnahme wäre dann nicht zulässig.

Wird nun für die j_{12} -Bestimmung die äußere Oberfläche der Haut mit einer tracerhaltigen Lösung in Kontakt gebracht, so nimmt die Haut nicht nur Tracer-Natrium in das Kompartiment 2 (C_2) auf, sondern auch in einen von außen erreichbaren extrazellulären Raum (Corneum, anhaftende Flüssigkeit). Dieser extrazellulär gelegene Anteil des aufgenommenen Tracer-Natriums muß bei der j_{12} -Bestimmung berücksichtigt werden. In der Literatur sind hierfür bereits verschiedene methodische Ansätze beschrieben worden.

6.2. j_{12} -Bestimmung mit Hilfe von ECR-Markern

Biber et al. (7, 5, 6) kalkultierten die Traceraufnahme in das Kompartiment 2 (C_2) durch Subtraktion des extracellulär gelegenen Natriums von der gesamten Traceraufnahme der Haut (C_S). Dabei wurde das extracellulär gelegene Tracer-Natrium aus dem mit ECR-Markern (Inulin, Mannitol) bestimmten Verteilungsraum, der Natriumkonzentration ($[Na]_{ECF}$) und der spezifischen Aktivität (p_1) der epithelialen Badelösung ermittelt:

$$C_2 = C_S - ECR \cdot [Na]_{ECF} \cdot p_1 \quad (5)$$

In diesen Versuchen wurde die Natriumaufnahme bei der konstanten Expositionszeit bestimmt. Unter der Annahme einer mit der Zeit linearen Natriumaufnahme ergibt sich daher aus Gleichung (4) und (5):

$$j_{12} = \frac{C_S - ECR \cdot [Na]_{ECF} \cdot p_1}{p_1 \cdot t} \quad (6)$$

Die Bestimmung des j_{12} nach dieser Gleichung ist von der korrekten Ermittlung des ECR abhängig. Der mit diesem Verfahren ermittelte j_{12} zeigt jedoch eine Abhängigkeit von dem verwendeten ECR-Marker (7, 5, 6). Mit Inulin wird in-

nerhalb kurzer Versuchszeiten (unter 4 min) nicht der gesamte von außen zugängliche extrazelluläre Raum erfaßt (7, 29); der j_{12} wird daher zu groß bestimmt. Das besser diffusible Mannitol ergibt innerhalb kurzer Versuchszeiten größere Räume als das Inulin. Ob es jedoch eine vollständige Korrektur des nicht in Kompartment 2 befindlichen Tracer-Natriums ermöglicht, bleibt fraglich.

6.3. j_{12} -Bestimmung mit der Flutmethode

Cereijido und Rotunno (16, et al. 75) haben 1970 eine Versuchsanordnung beschrieben, mit der bei der Ermittlung des j_{12} das im ECR gelegene Tracer-Natrium nicht besonders berücksichtigt werden muß. Dieses Vorgehen wurde von der Annahme ausgehend gewählt, daß das im extracellulären Raum gelegene Tracer-Natrium bei einer Haut an allen Stellen gleich groß ist. Die an einzelnen Hautstücken bestimmbare Gesamtaktivität (C_S) sollte sich demnach aus einem konstanten von ECR herrührenden Anteil und einem von der Kontaktzeit abhängigen Anteil im Kompartment 2 (C_2) zusammensetzen. In einer Versuchsanordnung, bei der an einer Haut die Natriumaufnahme bei verschiedenen Kontaktzeiten gemessen werden kann, gilt daher (nach Gleichung (4)):

$$\frac{dC_S}{dt} = \frac{dC_2}{dt} = j_{12} \cdot P_1 \quad (7)$$

Die für die j_{12} -Bestimmung nach Gleichung (7) notwendigen unterschiedlichen Kontaktzeiten an ein und derselben Haut wurden durch eine Flutkammeranordnung erreicht:

Die Froschhaut ist in einer Kammer eingespannt. Vor dem Versuch werden die Kammerhälften entleert. Die Testlösungen werden dann so injiziert, daß der Flüssigkeitsspiegel in beiden Kammerhälften gleichmäßig ansteigt. Auf diese Weise kommen die unteren Teile der Epithelseite der Haut längere Zeit mit der radioaktiv markierten Lösung in Kontakt als die oberen. Nach dem Versuch wird die Haut in Einzelstücke zerschnitten.

Jedem Einzelstück entspricht eine bestimmbare mittlere Kontaktzeit mit der aktiven Lösung. Trägt man die Aktivität der Hautstücke (C_S) gegen die zugehörigen Kontaktzeiten auf, so erhält man aus der Steigung der Geraden, die die Meßpunkte miteinander verbindet, den Differentialquotienten dC_S/dt und mit ihm nach Gleichung (7) den j_{12} . Bei diesem Vorgehen kann die zeitliche Abhängigkeit der Natriumaufnahme direkt beobachtet werden. Im Prinzip läßt sich also die Voraussetzung für die Berechnung des j_{12} aus der Traceraufnahme, $dC_2/dt = \text{konst.}$ (Gleichung (4)), im Versuch selber bestätigen ($dC_S/dt = \text{konst.}$).

6.4. Zur Methodik der j_{12} -Bestimmung bei den vorliegenden Versuchen

Die von uns gewählte Versuchsanordnung entsprach bis auf einige Modifikationen, die im Folgenden beschrieben werden, der von Cerejido et al. (75) beschriebenen Anordnung.

6.4.1. Korrektur des extracellulär gelegenen $^*\text{Na}$

Die j_{12} -Bestimmung mit der Flutmethode erlaubt es im Prinzip, den im von außen erreichbaren ECR gelegenen Anteil der aufgenommenen Tracermenge unberücksichtigt zu lassen, solange dieser Anteil an allen Hautstücken gleich groß ist. Die Voraussetzung eines konstanten im ECR gelegenen Natriumanteils scheint allerdings nicht erfüllt zu sein, da die Hautstücke von verschiedenen Froschhautpartien offensichtlich unterschiedlich große von außen erreichbare extracelluläre Räume aufweisen (s. 6.5.2.).

Insbesondere bei der Verwendung von Inkubationslösungen mit relativ hoher Natriumkonzentration (Frosch-Ringerlösung) sollte ein über die exponierte Fläche inhomogen verteilter ECR das Meßergebnis für den j_{12} stark verfälschen können. Bei kurzen Versuchszeiten und normalem Frosch-Ringer ist der extracellulär gelegene Anteil der gesamten Traceraufnahme wesentlich größer als der Anteil, der in die-

ser Zeit vom Kompartiment 2 aufgenommen wurde: Beim Auswasch der von epithelial mit Tracer-Natrium aufgeladenen und anschließend mit Filterpapier abgetupften Haut wird auf der Epithelseite eine Natriummenge beobachtet, die so schnell ausgewaschen wird, daß nur eine extracelluläre Lokalisation in Frage kommt. Im Vergleich zu dieser Natriummenge (70 neq/cm^2 ; Moshagen, persönliche Mitteilung) ist die Natriumaufnahme im Kompartiment 2 innerhalb kurzer Versuchszeiten verhältnismäßig gering (s. Ergebnisse: Bei 40 sec ca. 20 neq/cm^2).

Relativ geringe Änderungen des $^*\text{Na}_{\text{ECR}}$ (extracelluläres Natrium) führen daher zu großen Fehlern in der j_{12} -Bestimmung. Um diese möglichen Fehler auszuschließen oder gering zu halten, haben wir versucht, das extracellulär gelegene Tracer-Natrium vor der Bestimmung der von der Haut aufgenommenen Radioaktivität zu entfernen. Als Möglichkeit bietet sich das Abspritzen der Epithelseite der Haut unmittelbar nach dem Versuch (Exposition) an. Wir haben dazu (ebenso wie Cereijido, pers. Mitteilung) isotone Sucroslösung verwandt. Mit der Elektronenstrahlmikrosonde läßt sich der Effekt des Abspritzens demonstrieren.

Abbildung 14 zeigt drei mit der Elektronenstrahlmikrosonde gewonnene Röntgenspektren des Corneums ein und derselben Haut. Das nicht abgetupfte Corneum zeigt wesentlich höhere Natrium- und Chloridkonzentrationen als das mit Filterpapier abgetupfte. Nach Abspritzen mit Sucroslösung ist praktisch kein NaCl (besonders leicht am Cl-Peak ablesbar!) mehr im Corneum nachweisbar. Die zellulären Natriumkonzentrationen ändern sich durch das Abspritzen nicht (Dörge, pers. Mitteilung).

Die nach dem Abspritzen mit Sucroslösung aus den SONDENSpektren kalkulierten Natriummengen im ECR sind im Vergleich zur Natriumaufnahme im Kompartiment 2 sehr klein, so daß angenähert gelten kann $C_S = C_2$. Eine Korrektur des ECR-Natriums mit Hilfe von ECR-Markern kann daher entfallen.

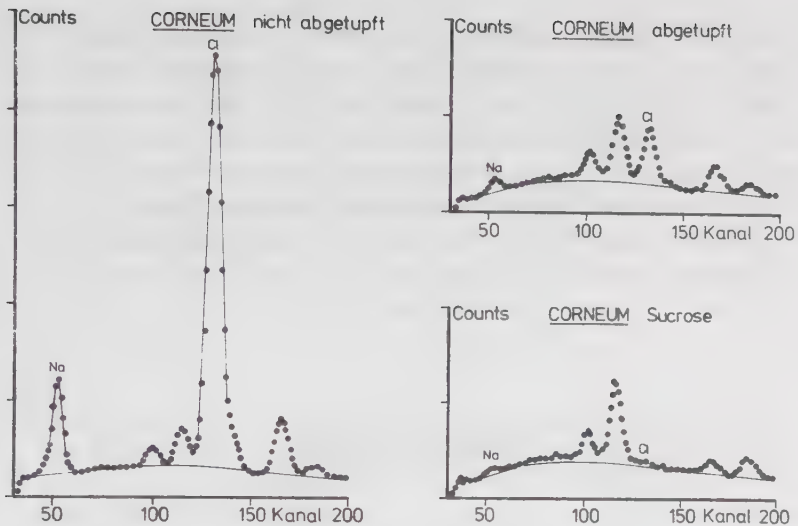


Abb. 14: Mit der Elektronenstrahlmikrosonde gewonnene Vielkanalspektren von gefriergetrockneten Schnitten des Corneums an Stücken derselben Haut. Die Höhe der Peaks ist proportional zur Elementkonzentration im durchstrahlten Material. Die einzelnen Hautstücke wurden unterschiedlich vorbehandelt: Außen nicht abgetupft, außen mit Filterpapier abgetupft, mit natriumfreier Sucroselösung abgespritzt.

6.4.2. Ermittlung des j_{12}

Im Gegensatz zu dem von Cereijido ursprünglich gewählten Verfahren (Bezug der Natriumaufnahme auf mg Gewebe) haben wir die Natriumaufnahme direkt pro Flächeneinheit bestimmt. Damit läßt sich ohne weitere Umrechnung der j_{12} (Natriumfluß je Flächeneinheit) ermitteln. Um definierte Flächen zu erhalten, benutzten wir feste Schneideblöcke, mit denen

die Haut in genau gleich große Stücke zerteilt wurde (Abb. 15). Es wurden wahlweise 9 Hautstücke mit je $0,5 \text{ cm}^2$ oder 18 mit je $0,25 \text{ cm}^2$ ausgeschnitten. Die Traceraufnahme je cm^2 wird durch Multiplikation mit 2 bzw. 4 erhalten. Auf Grund der festen Anordnung der Messerklingen in den Schneideblöcken ist bei bekannter Gesamtflutzeit t_G (Zeit vom Beginn des Flutens bis zum Erreichen des oberen Kammerandes) die mittlere Kontaktzeit des einzelnen Hautstücks, t_S , direkt zu ermitteln:

$$t_S = (1 - f_S) \cdot t_G + t_B \quad (8)$$

f_S errechnet sich aus dem mittleren Abstand des ausgeschnittenen Hautstücks vom Kammerboden dividiert durch die Gesamthöhe der Kammer ("fraktionelle Höhe"). Als t_B (Basiszeit) wird die Zeit vom Ende des Flutens bis zum Abspritzen mit isotoner Sucroslösung (ca. 2 sec) addiert. Die Kontaktzeit zählt bis zum Abspritzen der Haut mit Sucroslösung, da erst dadurch die Traceraufnahme der Haut beendet wird. Voraussetzung für die Berechnung von t_S nach Gleichung (8) ist die Konstanz der Infusionsgeschwindigkeit. In der Versuchsanordnung betrug die maximale Abweichung der Infusionsgeschwindigkeit vom Mittelwert 0,3%. Auf Grund der nahezu vollständigen Entfernung des $^*\text{Na}_{\text{ECR}}$ durch das Abspritzen mit Sucroslösung vereinfacht sich Gleichung (6) zu:

$$C_S = C_2 = j_{12} \cdot t_S \cdot P_1 \quad (9)$$

Für die aus P_1 und C_S berechnete Natriumaufnahme der Hautstücke gilt daher

$$^*\text{Na} = \frac{C_S}{P_1} = j_{12} \cdot t_S \quad (10)$$

Trägt man $^*\text{Na}$ (neq/cm^2) der Hautstücke gegen die nach Gleichung (8) bestimmten Kontaktzeiten t_S (sec) auf, so zeigt sich eine lineare Beziehung:

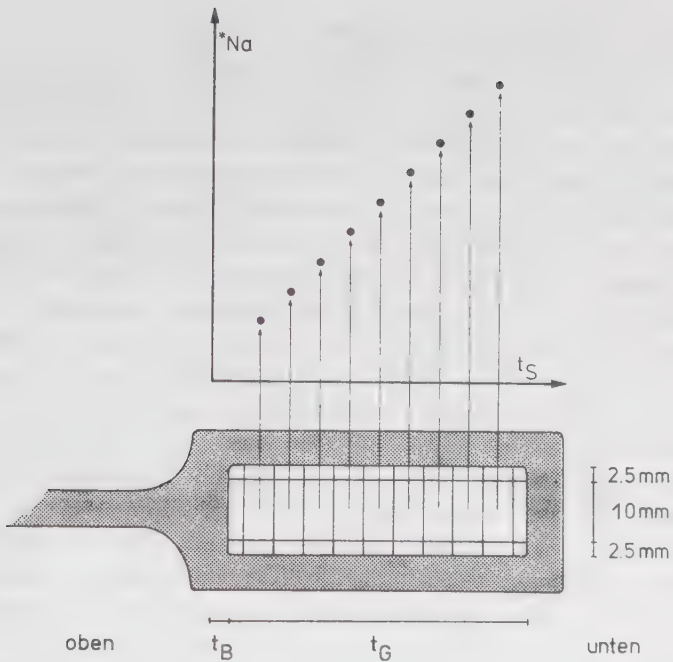


Abb. 15: Gewinnung der einzelnen Hautstücke (Proben) und Bezug der Natriumaufnahme ($*Na$) der einzelnen Hautstücke auf die zugehörige Kontaktzeit. Im Rahmen (unten) ist die Anordnung der Messerklingen in den Schneideblöcken eingezeichnet (für den Fall der Gewinnung von 9 Proben zu je $0,5 \text{ cm}^2$). Weitere Erläuterung im Text.

Dies ist nach Gleichung (10) zu fordern, da $*Na$ und t_s über den Faktor j_{12} zueinander direkt proportional sind. Die Steigung der Geraden, die die Punkte verbindet, entspricht also dem j_{12} . Um ein objektives Maß der Steigung zu erhalten, wurde die Regressionsgerade errechnet (s. 5.1.).

6.4.3. Kurzschlußbedingungen

Um den j_{12} mit anderen Parametern des Natriumtransportes vergleichen zu können, wurden die Häute im Gegensatz zu der von Cereijido beschriebenen Methode mit Ausnahme einer Versuchsserie im kurzgeschlossenen Zustand untersucht, d.h. die Angaben über den j_{12} beziehen sich im Allgemeinen auf den Kurzschlußfall. Um den ständigen Kurzschluß der Haut zu gewährleisten, wurde die Kompensation automatisch durchgeführt (s. 2.3.). Durch eine besondere Anordnung der Strom- und Spannungselektroden (vergl. Abb. 11) war es möglich, die Haut auch beim Flutvorgang kurzzuschließen. Dabei wird nur der jeweils von der Flüssigkeit gespülte Teil der Haut auf Null kompensiert. Abbildung 16 zeigt eine SCC-Schreibung während des Flutens. Die lineare Zunahme des SCC mit der Zeit ist zu erwarten, da mit ansteigendem Flüssigkeitsspiegel immer größere Anteile der Haut kurzgeschlossen werden. Auf Grund der konstanten Infusionsgeschwindigkeit sind Zeit und Höhe des Flüssigkeitsspiegels direkt proportional. Die exzentrische Anordnung der Potentialelektroden (Abb. 11) führt weder zu Fehlern in der Nullklemmung noch zu falsch bestimmten Hautpotentialen, da die Leitfähigkeit der benutzten Lösungen im Vergleich zur Leitfähigkeit der Haut ($0,5 \text{ mS/cm}^2$) hoch war.

Abbildung 17 demonstriert dies am Beispiel eines ungünstigen Extremfalls. Aber auch hierbei beträgt der maximale Relativfehler gegenüber dem mittleren Potential nur etwa 1%.

Durch die gleichzeitige Bestimmung von j_{12} und SCC ist es möglich, Natriumeinstrom und SCC (= Nettoeinstrom) miteinander zu korrelieren. Der j_{12} wird daher teilweise als Mehrfaches des Netto-Natriumtransfers (SCC) angegeben:

$$\text{Quotient} = \frac{j_{12} (\mu\text{eq/cm}^2 \cdot \text{h})}{\text{SCC} (\mu\text{eq/cm}^2 \cdot \text{h})}$$

Die Differenz von j_{12} und SCC entspricht dem Teil des j_{12} , der über den Netto-Natriumtransfer der Haut hinausgeht.

Unter bestimmten Voraussetzungen (s. Diskussion) ist er gleich dem j_{21} . Die j_{12} -Bestimmung unter SCC-Bedingungen ermöglicht also eine Aussage über den gleichzeitigen Natriumausstrom über die äußere Barriere (j_{21}).

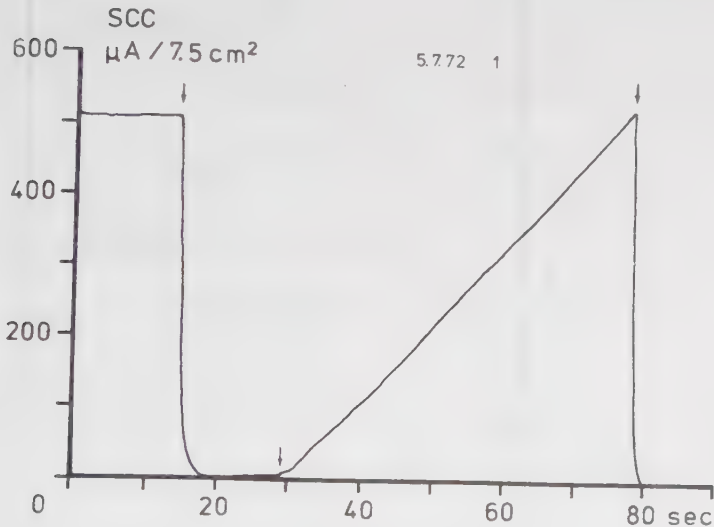


Abb. 16: SCC-Schreibung während des Flutens (Kontrollbedingungen). Die Pfeile bedeuten (von links): Absaugen der Lösungen des Vorlaufs, Flutbeginn, Ende des Flutens mit Absaugen der Testlösungen.

6.5. Inhomogenität des biologischen Objektes

Die Bestimmung des j_{12} mit der Flutmethode setzt den Idealfall einer in sich homogenen Haut voraus, d.h. die einzelnen Hautstücke müssen untereinander in Bezug auf Funktion und Morphologie völlig gleich sein. Die Froschhaut als biologisches Objekt erfüllt diese Voraussetzung jedoch nicht. In Paarversuchen an Stücken derselben Haut lassen

sich diese Inhomogenitäten der Funktions- und morphologischen Parameter demonstrieren. Um die aus der Inhomogenität der Haut resultierenden Fehler der j_{12} -Bestimmung abschätzen und - falls möglich - verringern zu können, wurde die Froschhaut bezüglich dieser Inhomogenitäten untersucht.

6.5.1. SCC-Korrektur

Prinzipiell sollte sich der j_{12} aus zwei beliebigen Punkten (n,m) der Aufnahmegeraden (Abb. 21) berechnen lassen als

$$j_{12(n,m)} = \frac{\Delta \cdot Na}{\Delta t} \quad (11)$$

Nach Gleichung (10) ergibt sich

$$j_{12(n,m)} = \frac{j_{12(n)} \cdot t_n - j_{12(m)} \cdot t_m}{t_n - t_m} = \frac{(t_n - t_m) \cdot j_{12}}{t_n - t_m} = j_{12} \quad (12)$$

Der aus Gleichung (12) gezogene Schluß von $j_{12(n,m)}$ auf j_{12} ist jedoch nur zulässig, wenn $j_{12(n)} = j_{12(m)}$. Dies setzt voraus, daß der j_{12} an allen Stellen gleich groß ist. Dies ist jedoch, wie Paarversuche an seitensymmetrisch gleichen Hälften derselben Froschhaut zeigten, nicht der Fall: Der SCC der beiden Hälften differierte durchschnittlich um 25%, der j_{12} sogar um 41% (Kontrollbedingungen, $n = 26$, j_{12} ohne die hier beschriebene SCC-Korrektur bestimmt).

Aufschlüsse über die Inhomogenität des j_{12} innerhalb einer Haut lassen sich auch aus dem Verlauf des SCC während der Flutphase gewinnen. Er zeigte bei der Mehrzahl der untersuchten Häute einen nicht linearen Anstieg (Abb. 18).

Dieser Verlauf war identisch reproduzierbar und zeigte keine Abhängigkeit von der Absaug- oder Anflutgeschwindigkeit. Auch die Wahl des Ausgangspunktes für das Ab- oder Anfluten hatte auf die Gestalt der Kurve keinen Einfluß.

Der nicht-lineare SCC-Verlauf zeigt eine Inhomogenität der Haut bezüglich ihrer Netto-Natriumtransportleistung (SCC)

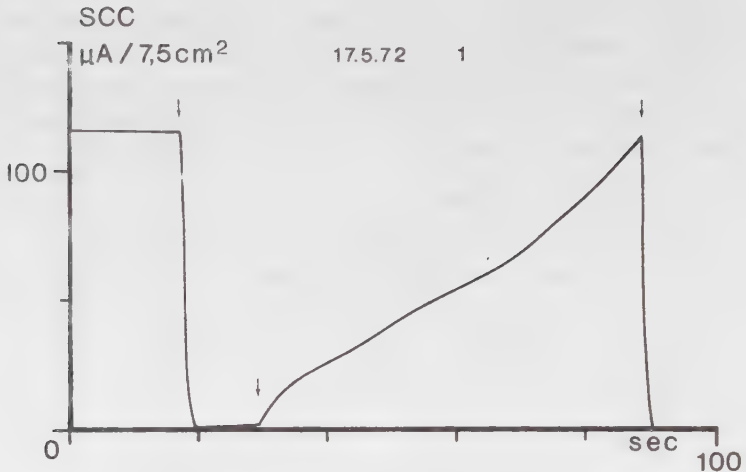


Abb. 18: SCC-Schreibung während des Flutens. Haut mit nicht-linearem Verlauf der Schreibung. Die Pfeile bedeuten (von links): Absaugen der Lösungen des Vorlaufs, Flutbeginn, Ende des Flutens mit Absaugen der Testlösungen.

an: Die SCC-Schreibung beim Fluten läßt sich als Integral aller differentiellen (örtlichen) Transportleistungen der kurzgeschlossenen Haut auffassen. Die Ableitung dieser Schreibung (Abb. 19) ergibt dann den örtlich unterschiedlichen (differentiellen) SCC der Haut.

Eine entsprechende Inhomogenität zeigt sich, wenn man den örtlichen j_{12} der einzelnen Hautstücke ermittelt. Es ergibt sich, daß der örtliche j_{12} und SCC zueinander direkt proportional sind. Eine entsprechende Proportionalität zwischen j_{12} und SCC kann auch an der ganzen Haut bei unterschiedlicher Transportleistung gefunden werden (S. V 1. und V 2.).

Die aufgezeigten Unterschiede des j_{12} innerhalb einer Haut führen bei der Ermittlung des j_{12} aus der Steigung der Ge-

len Kurzschlußstrom ($\text{SCC}/\overline{\text{SCC}}$, s. Abb. 19) geteilt wurde. Auf diese Weise erhält man die auf einen durchschnittlichen SCC bezogene Natriumaufnahme.

Diese Normierung wird im Folgenden SCC-Korrektur genannt. Abbildung 20 zeigt das Ergebnis des Korrekturverfahrens am Beispiel einer Haut.

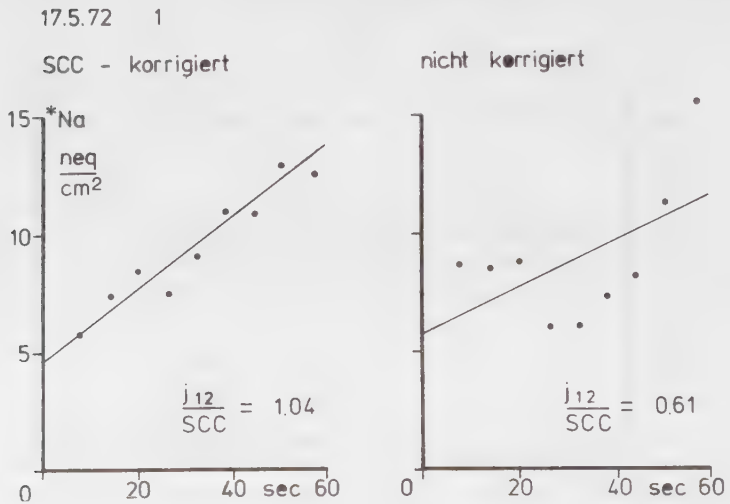


Abb. 20: Auswirkung der SCC-Korrektur, dargestellt am Beispiel derselben Haut wie in Abb. 18 und 19. Rechts ohne Korrektur: Der aus der Regressionsgeraden bestimmte j_{12} ist kleiner als der SCC (nicht möglich!). Links mit Korrektur: Die Streuung der Einzelpunkte ist stark reduziert. Der Quotient aus j_{12} und SCC ergibt einen plausiblen Wert.

Das Ergebnis der SCC-Korrektur, eine beachtliche Reduktion der Streuung der einzelnen Meßpunkte, spricht für die Richtigkeit der (begründeten) Prämisse, daß SCC und j_{12} zueinander direkt proportional sind. Einem möglichen Einwand, in den Ergebnissen sehe man nur das, was man vorher als Prämisse hineingesteckt habe, ist zu begegnen: Die Ergebnisse der Versuchsreihen mit SCC-Korrektur unterscheiden sich nicht systematisch von denen ohne Korrektur. Lediglich die Standardabweichung (SD) und der Fehler des Mittelwertes (SEM) sind erheblich kleiner.

Die Relation von j_{12} und SCC (= Quotient) wird durch das Korrekturverfahren im übrigen nicht beeinflusst. Die SCC-Korrektur ist also ein Verfahren, mit dem es möglich ist, einen Teil der Inhomogenität des biologischen Objektes zu berücksichtigen.

6.5.2. Intercept, *Na_{ECR}

Bei der Betrachtung der Aufnahmegeraden (Abb. 21) fällt auf, daß sie nicht genau durch den Koordinatenschnittpunkt geht. Sie schneidet die Ordinate in einer bestimmten Höhe (= Intercept). Im Mittel von 68 Versuchen (Normalbedingungen) ergab sich ein Intercept von $2,4 \text{ neq Na/cm}^2$ (SEM 0,37). Die Interpretation, daß diese Natriummenge dem extracellulär gelegenen Tracer-Natrium entspricht, das durch das Abspritzen mit Sucroselösung nicht entfernt werden konnte, stützt sich auf eine Reihe von Beobachtungen und Überlegungen.

Die Größe des Intercept zeigt eine Abhängigkeit von der Dauer des Abspritzens. Bei flüchtigem Abspritzen ist der Intercept erhöht. Frösche, die im Begriff sind, sich zu häuten, zeigen einen auffallend großen Intercept (s. Abb. 22). Frösche, die einige Wochen in Kälte ($5 - 8^{\circ} \text{C}$) gehalten wurden, weisen einen größeren Intercept auf. Unter den Bedingungen, bei denen ein vergrößerter Intercept beobachtet wurde, zeigten elmi-Bilder ein vergrößertes Stratum corneum. Bei den Versuchen mit niedrigen Natriumkon-

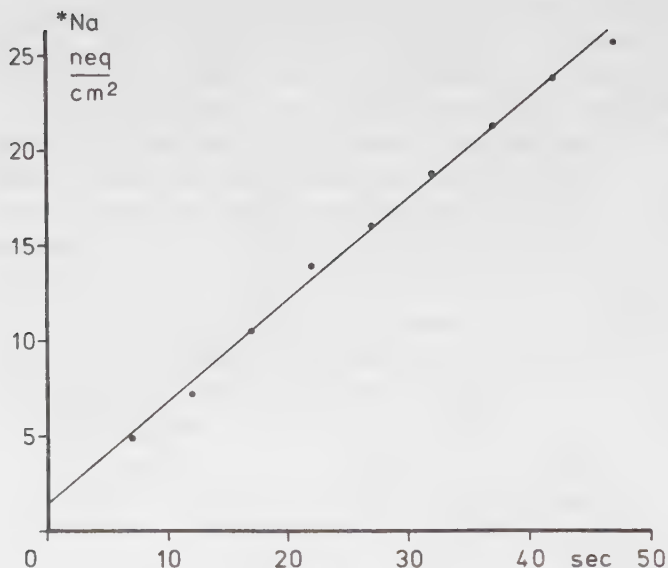


Abb. 21: Aufnahme Gerade bei Kontrollbedingungen.

zentrationen ist der Intercept ebenfalls erniedrigt ($0,7 \text{ neq/cm}^2$ (SEM $0,2$), s. auch Abb. 30). Im Allgemeinen zeigte der Intercept keine Abhängigkeit vom Funktionszustand der Haut (s. Abb. 23 und 29). Auch bei kurzen Versuchszeiten konnte der Aufbau dieser Natriummenge nicht verfolgt werden. Bei der minimal möglichen mittleren Kontaktzeit des ersten Sample ($t_g = 4,5 \text{ sec}$) trat dieses Natrium bereits voll in Erscheinung. Die Aufbauhalbwertszeit sollte daher maximal $2 - 3 \text{ sec}$ betragen. Ein derartig schneller Austausch spricht für eine extracelluläre Lokalisation dieser Natriummenge, $^*\text{Na}_{\text{ECR}}$.

Bei dieser Interpretation des Intercept ergeben sich für das Abspritzverfahren mit Sucroslösung in etwa gleiche Werte wie sie mit der Elektronenstrahlmikroanalyse erhal-

ten wurden (Abb. 14). Bei Umlage auf den von außen zugänglichen ECR von $0,5 \mu\text{l}/\text{cm}^2$ ((7), mit Mannitol ermittelt) entspricht das $^*\text{Na}_{\text{ECR}}$ einer Konzentration von $4,8 \text{ meq/l}$ im Extracellulärraum (Elmi-Bilder der von uns verwendeten Froschhäute zeigten teilweise noch größere ECRs). Demnach wurden mindestens 96% des im ECR gelegenen Tracer-Natriums durch das Abspritzverfahren entfernt.

Das $^*\text{Na}_{\text{ECR}}$ wirkt sich bei gleichmäßiger Verteilung über die ganze Haut als Parallelverschiebung der Aufnahmegeraden nach oben aus. Es gibt jedoch eine Reihe von Hinweisen dafür, daß der von außen erreichbare ECR und ebenso das $^*\text{Na}_{\text{ECR}}$ innerhalb einer Haut örtlich Unterschiede auf-

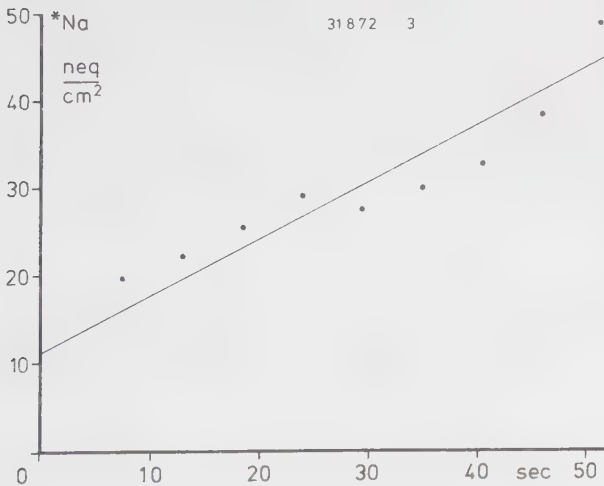


Abb. 22: Aufnahmegerade einer Froschhaut. Die Haut ist zum Teil abgehäutet. Die Punkte 5 - 8 (abgehäutet) sind gegenüber den Punkten 1 - 4 und 9 (noch nicht abgehäutet) parallel verschoben.

weisen (vergleiche 6.5.1) können (Abb. 22!). Bei der Inhibition des Natriumtransportes treten diese relativ zur Gesamtnatriumaufnahme stärker hervor. Seitensymmetrisch gleiche Teile derselben Froschhaut zeigten eine parallele Verteilung der Natriumaufnahme trotz völlig verschiedener Art der Transportinhibition (Abb. 23).

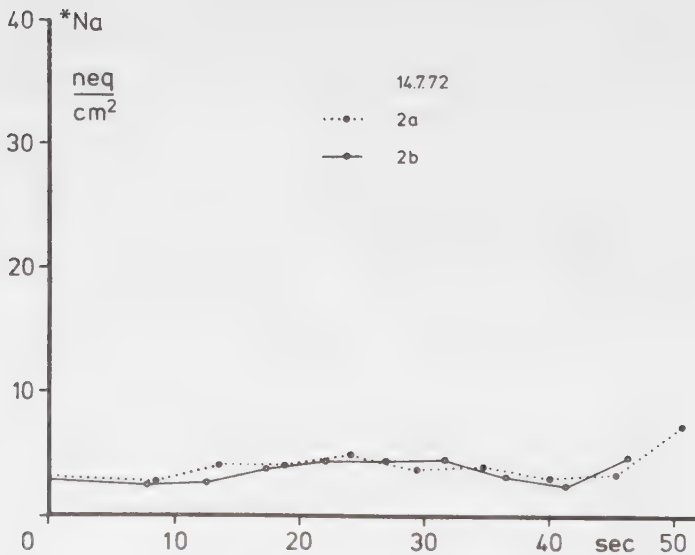


Abb. 23: Natriumaufnahme gleichsinnig eingespannter, seitensymmetrisch gleicher Teile derselben Haut bei verschiedenartiger Inhibition des Transportes. Die geringfügige Verschiebung beruht auf unterschiedlichen Gesamtflutzeiten.
2 a Inhibition durch g-Strophantin (10^{-4} M)
2 b Inhibition durch niedrige Temperatur (0° C).

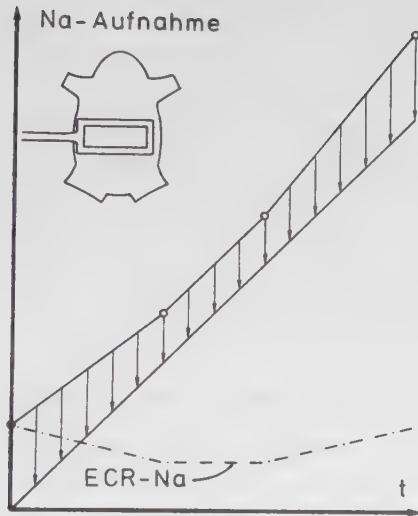


Abb. 24: Mittlere Aufnahmekurve (Kreise) bei quereingespannten Hautstücken ($n = 14$). Die unterbrochene Linie entspricht dem angenommenen ${}^*Na_{ECR}$ (siehe Text).

Wenn derartige Unterschiede des ${}^*Na_{ECR}$ an den Froschhautstücken systematisch verteilt sind, verfälschen sie die j_{12} -Bestimmung. In einem Kollektiv von Versuchen ($n = 14$), bei denen quer zur Längsachse des Frosches zugeschnittene Hautstücke in die Rahmen eingespannt wurden (s. Abb. 24), ergab sich im Mittel eine geringe, jedoch signifikante ($2 P < 0,01$) Abweichung der uptake-Kurve von der Linearität. Histologische Bilder der Froschhaut zeigen an der Seite und am Rücken der Tiere eine verstärkte Verhornung bzw. vermehrte Drüsenanteile. Beide morphologischen Merkmale bedeuten funktionell eine Vergrößerung des von außen erreichbaren ECR. Mit Annahme einer dem histologischen Bild entsprechenden Verteilung des ECR-Natriums ${}^*Na_{ECR}$

kann die verzerrte Aufnahmekurve auf eine lineare $^*\text{Na}/t_5$ -Beziehung reduziert werden (Abb. 24). Die zunehmende Steilheit der Aufnahmekurve in Abbildung 24 läßt sich nicht dadurch erklären, daß die spezifische Aktivität vor der äußeren Barriere sich erst mit einer größeren Zeitverzögerung an die der epithelialen Badelösung (p_1) angleicht. Die Beobachtung von Soforteffekten auf den j_{12} bei Konzentrationswechsel (s. Ergebnisse), die Sofortwirkung von Amilorid, schnelle Effekte der Natriumkonzentration auf PD und SCC (50) und die Kalkulation der Diffusionszeiten (unstirred layer = 50 μ (21)) lassen nämlich darauf schließen, daß der Konzentrationsausgleich an der äußeren Barriere innerhalb einer Sekunde abgeschlossen ist.

Um Fehler, die möglicherweise durch geringe Unterschiede des ECR zwischen Brust- und Bauchpartien auftreten könnten, zu vermeiden, wurden die Häute so in den Rahmen eingespannt, daß sich abwechselnd die Bauchpartie und die Brustpartie oben befanden. Selbst bei dieser Anordnung sind bei im Mittel nur leicht unterschiedlichen ECRs der oberen und unteren Bauchhaut geringe Fehler bei der j_{12} -Bestimmung zu erwarten. Da die Häute abwechselnd nach oben und unten in die Rahmen eingespannt wurden, resultiert daraus jedoch kein systematischer Fehler. Eine Analyse aller Aufnahmegeraden mit längseingespannter Haut bei steady state-Bedingungen ergab im Mittel keine Abweichung von der Linearität.

Der Annahme, daß der Intercept dem $^*\text{Na}_{\text{ECR}}$ entspricht, steht die Beobachtung entgegen, daß bei den Versuchen mit Strophantin der Intercept erhöht ist (6,0 neq/cm²). Gegenüber einem Vergleichskollektiv gleicher Frösche (*Rana esculenta*, zur selben Jahreszeit, 4,8 neq/cm²) ist diese Erhöhung jedoch nicht signifikant.

6.5.3. Randeffekte

Bei aller Untersuchungen an isolierter Häuten in Ussing-kammern werden Teile des Epithels wegen der notwendigen

Abdichtung der beiden Kammerhälften gequetscht. Die Quetschung der Haut in den Randbezirken beeinflusst offenbar auch die Funktionsparameter der benachbarten, nicht gequetschten Haut ("edge damage"). Widerstand und Potential der Haut sind gegenüber Anordnungen, in denen eine Quetschung der Haut vermieden wird, erniedrigt (41). In der Nähe der Quetschzone lassen sich daher erhöhte passive Ionenflüsse erwarten. Die Ermittlung des j_{12} mit der Flutmethode basiert auf der Homogenität der verwendeten Hautstücke. Daher müssen etwaige Randeffekte neben den sonstigen Inhomogenitäten des biologischen Objektes (s.o.) berücksichtigt werden.

Die mit der SCC-Schreibung beim Fluten erfaßbaren örtlichen Transportleistungen (differentieller SCC) zeigten am oberen und unteren Rand der Kammer gehäuft etwas höhere Werte (s. auch Abb. 19). Diese Beobachtung war jedoch nicht statistisch zu sichern.

Ähnlich den SCC-Schreibungen wurden auch Potentialschreibungen der Haut beim Fluten durchgeführt. Sie entsprachen in ihrem Verlauf zum Teil den aus dem differentiellen SCC unter der Annahme gleicher örtlicher Widerstände berechenbaren Werten. Aus der Abweichung des beobachteten Potentials von dem so errechneten Sollpotential lassen sich mit einem komplizierten Auswertungsverfahren die örtlichen Widerstände ermitteln. Derartige Versuche zeigten wiederholt einen erniedrigten Widerstand in den Randbereichen der Haut (Abb. 25, unterer Rand). Dieser Effekt reichte jedoch nicht weit in die ausgestellte Hautfläche hinein (im allgemeinen ca. 3 mm).

Ein erniedrigter Hautwiderstand sollte bei Flußbestimmungen im kurzgeschlossenen Zustand keine bedeutende Rolle spielen. Wir haben dennoch, um einen möglichen Fehler durch den Randeffekt zu verringern, zwei technische Vorkehrungen getroffen: Der Rahmen für die Halterung der Haut wurde so konstruiert, daß die Haut am Rand der ausgestellten Fläche

noch nicht im vollen Ausmaß gequetscht wurde. Dies wurde durch die Abschrägung einer Rahmenhälfte erreicht (Abb. 10, Ausschnitt, 150 μm Abschrägungshöhe). Zweitens wurden jeweils 2,5 mm der randständigen Haut verworfen (Abb. 15).

Bei den Versuchsergebnissen zeigte sich, daß die Tracer-aufnahmen der obersten und untersten Hautstücke, die durch Randeffekte am stärksten betroffen sein müßten, von der Aufnahmegesamtheit nicht systematisch abwichen.

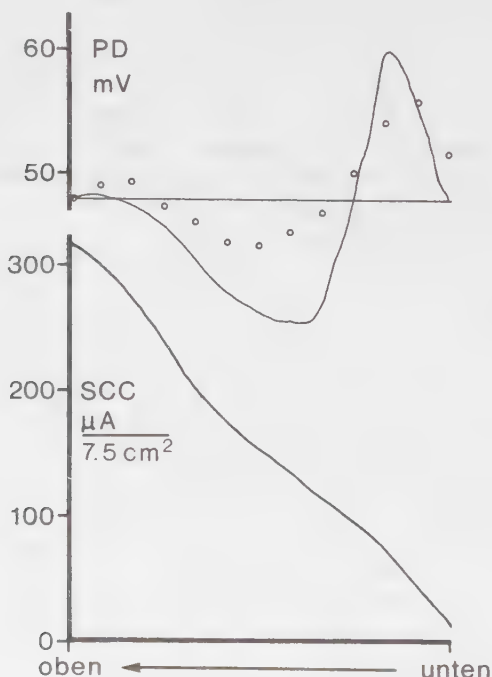


Abb. 25: PD-Verlauf (oben) und SCC-Verlauf (unten) derselben Froschhaut beim Fluten. Die Kreise entsprechen dem errechneten Sollpotential (Erläuterung im Text). Aus der Abweichung zwischen Sollpotential und tatsächlichem Potential errechnet sich für den unteren Rand der ausgestellten Hautfläche ein gegenüber dem durchschnittlichen Widerstand der Haut erniedrigter örtlicher Widerstand.

7. Meßfehler

In die Bestimmung des j_{12} gehen eine Reihe von Fehlern ein, die teils der Natur des biologischen Objektes, teilweise aber auch den Bestimmungsmethoden zuzuschreiben sind.

Selbst kleine Relativfehler bei der Bestimmung von Größen, die zur Kalkulation des j_{12} notwendig sind, können nach den Gesetzen der Fehlerrechnung (87) große Gesamtfehler bewirken. Im Folgenden werden alle Meßgrößen auf ihren Beitrag zum Gesamtfehler untersucht. (Im allgemeinen werden die Fehler, soweit die Größen in der Berechnung als Faktoren (Divisions-, Multiplikationsfaktoren) eingehen, als Relativfehler angegeben. Als Maß für den Fehler wird die einfache Standardabweichung genommen (SD), in einigen Fällen der Maximalfehler).

7.1. Kurzschlußstrom (SCC [$\mu\text{A}/\text{cm}^2$])

Die Kurzschlußstromautomaten wurden geeicht. Der Ablesewert am Schreiber differiert vom wahren Strom im äußeren Kreis maximal 2% (Ablesefehler, Drift zwischen den Eichungen, Eichfehler).

Die Eichpotentiale der Potentialelektroden wurden eliminiert. Eine geringe Drift dieser Eigenpotentiale während der Versuche liegt unter 0,1 mV. Selbst bei Konzentrationswechseln und Konzentrationsunterschieden blieben die Schwankungen unter 0,3 mV. Bei 30 mV Spontanpotential und linearer I/U-Relation der Haut (9) entstehen hieraus für den SCC maximal 1% Fehler. Die Referenzfläche (ausgestellte Haut) weicht im Mittel der Rahmen vom Sollwert leicht ab (7,56 cm^2 statt 7,50); dies wurde berücksichtigt.

7.2. Spezifische Aktivität (p_1 [cpm/neq Na])

Der Standard wurde durch zweifaches Pipettieren erhalten. Die benutzten Eppendorf-Pipetten zeigten einen Standardfehler von $\pm 1\%$. Die Zählraten der Standards lagen bei 40 000, woraus ein Zählfehler von 0,5% resultiert. Der

Standard und die Hautstücke hatten bei der Bestimmung der Zählrate die gleiche geometrische Anordnung zum Detektor. Die Natriumkonzentrationen der aktiven Lösung (flammenphotometrisch bestimmt) wichen von den Sollwerten (Einwaage) $\pm 2\%$ ab. Für jeden Versuch wurden Standardproben entnommen, deren Radioaktivität gleichzeitig mit der der Hautstücke bestimmt wurde. Eine Korrektur für den Zerfall konnte daher entfallen. Ebenso brauchte die geringfügige Abnahme der Radioaktivität durch Vermischung mit inaktiver Ringerlösung ($20 \mu\text{l/Versuch}$) nicht berücksichtigt werden. Die geringfügige Natriumkonzentrationsverminderung der radioaktiven Lösung, die sich bei Vorinkubation mit Lösungen niedriger Natriumkonzentration ergab, wurde für jeden Versuch bestimmt und berücksichtigt.

p_1 hat somit einen Bestimmungsfehler von $\pm 2,5\%$.

7.3. Traceraufnahme der Hautstücke (C_S [cpm/cm^2])

Die Zählraten der Proben bewegten sich im Bereich von 1 000 - 40 000 (Untergrund 100), entsprechend einem Zählfehler von 0,5 - 4%. Bei dem methodischen Vorgehen (s. 4.2.) konnte es innerhalb der zur Verfügung stehenden Zeit nicht zu einem nennenswerten Austausch von Radioaktivität zwischen den einzelnen Hautstücken und damit zu einer Verfälschung der Ergebnisse kommen (72, s. auch 75). Fehler, die daraus resultieren können, daß die Aktivität in den Ecken der Rahmen nicht so gut weggespritzt wird, sind auszuschließen, da die Randteile ($2,5 \text{ mm}$) nicht verwertet wurden. Bei unterschiedlich stark eingespannten Häuten können Unterschiede in der Größe der einzelnen Hautstücke auftreten. Dieser Fehler konnte nicht erfaßt werden, da eine brauchbare Methode zur Bestimmung der wirklichen Epitheloberflächen nicht zur Verfügung steht. Bei den Versuchen an der Gesamthaut sollte dieser Fehler gering sein, da das Corium eine beträchtliche Stützfunktion aufzeigt. Bei den isolierten Epithelien könnte daraus jedoch ein größerer Fehler resultieren.

7.4. Kontaktzeit (t_S [sec])

Die korrekte Bestimmung von t_S ist von der genauen Ermittlung der Gesamtflutzeit t_G , der Basiszeit t_B , der exakten Anordnung der Messerklingen und der Konstanz der Infusionsgeschwindigkeit abhängig (s. Gleichung (8)).

Die Konstanz der Infusionsgeschwindigkeit war mit 0,3% Maximalfehler gegeben. Die Zeiten wurden bis auf 1 sec Maximalfehler genau ermittelt. Für Versuche mit normaler Versuchsdauer (50 sec) konnte der Bestimmungsfehler daher für t_S bis zu 2% reichen.

Der aus 1. - 4. resultierende Meßfehler ergibt für die Bestimmung des j_{12} relativ zum SCC (= Quotient) einen Fehler von $\pm 4\%$ in der Einzelbestimmung. Da dieser Fehler stochastischer Natur ist, wirkt er sich auf die Bestimmung des mittleren Quotienten nicht aus.

IV) ERGEBNISSE

Die Ergebnisse, die mit der beschriebenen Methode gewonnen wurden, lassen sich in zwei Gruppen zusammenfassen:

1. j_{12} -Bestimmungen unter Kontrollbedingungen und bei Variation der Transportleistung der Haut. 2. Natrium-Transportpool-Bestimmungen, wobei die Grundlagen dieser von den üblichen Verfahren (37, 3, 46, 64) abweichenden Methoden zusammen mit den Ergebnissen erläutert werden.

1. j_{12} bei Normalbedingungen (Kontrolle)

Die Versuche wurden an kurzgeschlossenen Häuten von *Rana temporaria* und *Rana esculenta* unter steady state-Bedingungen mit 110er-Ringer auf beiden Seiten der Haut durchgeführt. Steady state-Bedingungen wurden dann angenommen, wenn der SCC im Vorlauf einen konstanten Wert erreicht hatte.

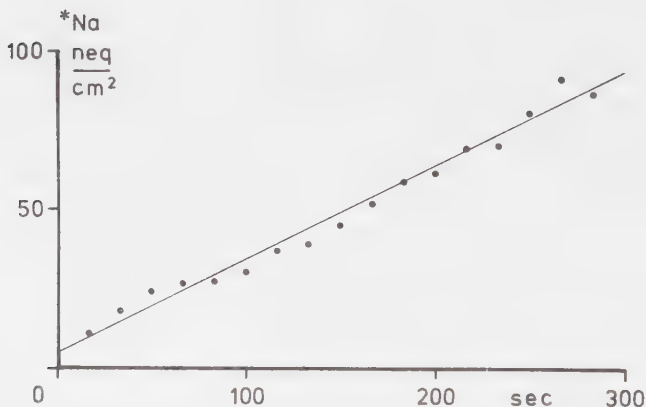


Abb. 26: Natriumaufnahme in Abhängigkeit von der Kontaktzeit bei einer Gesamtflutzeit von 300 sec.

Abbildung 26 zeigt die Natriumaufnahme unter Kontrollbedingungen an einem Einzelbeispiel über eine Gesamtflutzeit von 300 sec. Bei diesem Versuch steigt die Natriumaufnahme mit der Zeit linear an. In 5 weiteren Vorversuchen mit gleich langer Kontaktzeit war die Natriumaufnahme pro Zeit zumindest innerhalb der ersten 2,5 min konstant. Nach dieser Zeit konnte in der Hälfte der Versuche eine Abflachung der Aufnahmekurve beobachtet werden. Es läßt sich daher ableiten, daß es selbst nach 2 min noch nicht zu einem wesentlichen Abstrom von Tracer-Natrium aus dem Kompartiment 2 gekommen ist (nach Gleichung (2)). Bei Gesamtflutzeiten von nicht mehr als 60 sec, wie sie in allen übrigen Versuchen angewandt wurden, ist also eine korrekte j_{12} -Bestimmung aus der Aufnahmegraden gewährleistet.

Unter Kontrollbedingungen konnte gefunden werden, daß der aus der Tracer-Natriumaufnahme kalkulierte j_{12} ebenso wie der SCC jahreszeitlichen Schwankungen unterworfen war.

Im Frühjahr ergab sich in 24 Versuchen für den j_{12} ein Mittelwert von $0,90 \mu\text{eq}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$.

In Häuten von Fröschen, die im Sommer gefangen wurden, konnte dagegen für den j_{12} in 16 Versuchen mit einem Mittelwert von $1,57 \mu\text{eq}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$ ein um 75% größerer Wert gefunden werden. Der SCC zeigte im Vergleich zum j_{12} eine entsprechende Abhängigkeit von der Jahreszeit. Die Mittelwerte enthalten sowohl die Ergebnisse, die an Häuten von *Rana esculenta* wie auch an Häuten von *Rana temporaria* gewonnen wurden, da systematische Unterschiede zwischen den beiden Species nicht beobachtet wurden.

Die jahreszeitlichen Unterschiede im j_{12} und SCC könnten zumindest zu einem Teil auf eine im Sommer gegenüber dem Frühjahr (um einige Grade) erhöhte Temperatur im Versuchsräum zurückzuführen sein. Für die elektrischen Parameter (und unidirektionalen Flüsse) der Froschhaut und anderer

Amphibienhäute konnte in diesem Temperaturbereich eine Temperaturabhängigkeit gefunden werden (79, 70).

Der Quotient aus j_{12}/SCC errechnet sich ohne SCC-Korrektur zu 1,06 ($n = 23$, SEM 0,07) und mit SCC-Korrektur zu 1,07 ($n = 17$, SEM 0,04). Diese Mittelwerte enthalten Versuche, in denen der SCC von $0,35 - 3,5 \mu\text{eq}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$ reichte.

Bei Häuten von Fröschen, die zur gleichen Zeit untersucht wurden und in etwa gleiche Kurzschlußstromleistungen aufwiesen ("homogene Kollektive") reichte der Fehler des Quotienten in der Einzelbestimmung (SD) von 10% (SCC-korrigiert) bis zu 35% (nicht SCC-korrigiert).

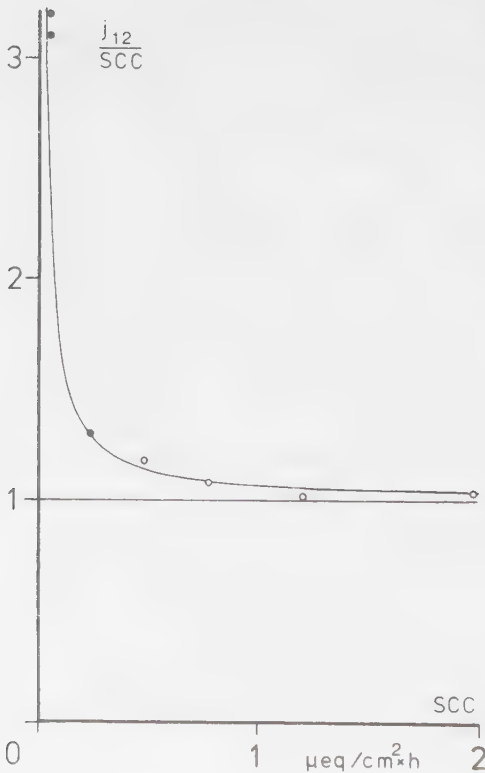


Abb. 27: Abhängigkeit des Quotienten aus j_{12} und SCC von der SCC-Leistung der Haut. Kreise = Kontrollbedingungen Punkte = Transportinhibition Werte in Tab. 2.

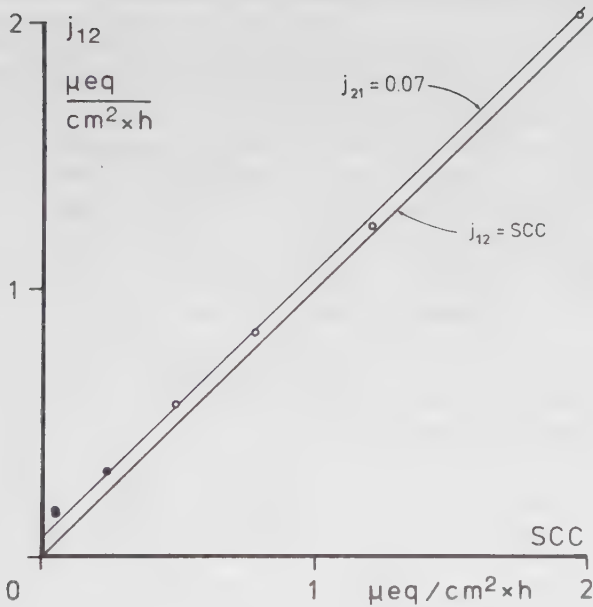


Abb. 28: j_{12} in Abhängigkeit von dem gleichzeitig bestimmten SCC. Die Punkte stellen Mittelwerte dar aus Kollektiven von $n \geq 10$.

Werte in Tab. 2. Bezeichnung wie in Abb. 27.

Obwohl der Quotient j_{12}/SCC über einen relativ großen Bereich spontan unterschiedlicher Transportleistungen nahezu konstant zu sein scheint (1,07 Mittelwert, SEM 0,04), zeigte er jedoch eine geringe Variation in Abhängigkeit von dem SCC. Die obere Hälfte der Tabelle 2 enthält in der vorletzten Spalte die Quotienten für vier verschiedene Kurzschlußstromleistungen. Wie aus der Tabelle und auch aus Abbildung 27 ersichtlich, nähert sich der Quotient für große SCC-Leistungen dem Wert 1. Bei niedrigen Transportleistungen steigt der Quotient an. Dies wird be-

Tabelle 2: Wertetabelle zu den Abbildungen 27 und 28

SCC			j_{12}	j_{21}	Quotient	
von	bis	$\bar{x}$	$\bar{x}$	$\bar{x}$	$\bar{x}$	SEM
0.00 - 0.65		0.49	0.57	0.08	1.18	0.10
0.65 - 0.90		0.78	0.84	0.06	1.08	0.12
0.90 - 1.50		1.21	1.24	0.03	1.02	0.08
über 1.50		1.98	2.04	0.06	1.03	0.03
Kälte		0.24	0.28	0.03	1.15	0.17
Amilorid		0.06	0.16	0.11	3.1	
Strophantin		0.06	0.18	0.12	3.2	

alle Flüsse in $\mu\text{eq}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$

In der oberen Hälfte sind 4 nach der Größe ihres SCC zusammengefaßte Kollektive unter Kontrollbedingungen aufgeführt. Die untere Hälfte gibt die Mittelwerte nach maximaler Inhibition der Haut mit Kälte (0°C), Amilorid (10^{-4}M) und Strophantin (10^{-4}M) an. Die Kollektive umfassen jeweils mindestens 10 Versuche.

sonders an Häuten sichtbar, bei denen die Transportleistung durch Kälte, Amilorid und Strophantin stark inhibiert wurde (Tabelle 2 untere Hälfte, Abb. 27 gefüllte Kreise). Aus Abbildung 28 ist die Ursache für diese Abhängigkeit des Quotienten vom SCC ersichtlich: Der j_{12} unterscheidet sich nämlich von dem SCC über den gesamten Bereich durch eine additive konstante Größe ($0,07 \mu\text{eq}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$). Der Verlauf der Hyperbel in Abbildung 27 kann daher mit der Gleichung $j_{12}/\text{SCC} = (\text{SCC} + 0,07)/\text{SCC}$ beschrieben werden.

Da der Kurzschlußstrom im steady state der Differenz der unidirektionalen Natriumflüsse entspricht, $\text{SCC} = j_{12} - j_{21}$, ist diese konstante Größe identisch mit dem j_{21} . Wie weit der so bestimmte j_{21} dem tatsächlichen Natriumaus-

strom aus der Haut nach der Epithelseite entspricht, wird bei V) 2. näher diskutiert.

2. j_{12} der nicht kurzgeschlossenen Haut

Nach dem Vorlauf wurde die Kurzschlußstromkompensation abgeschaltet. Die j_{12} -Bestimmung wurde entweder 1 oder 15 min danach im nicht kurzgeschlossenen Zustand durchgeführt. Der Vergleichswert für den so bestimmten j_{12} ist der letzte steady state-SCC im Vorlauf. Bei den 15 min-Versuchen wurde eine eventuell vorhandene geringe Drift des SCC im Vorlauf auf den Versuchszeitpunkt extrapoliert.

Im nicht kurzgeschlossenen Zustand sinkt der j_{12} relativ zu dem j_{12} bei Kurzschlußbedingungen um 30%. Der Quotient von j_{12}/SCC beträgt im Mittel aller Versuche 0,75 (SD 0,10, $n = 12$, von 1 signifikant verschieden: $p < 0,001$). Bei den Versuchen mit 1 min im nicht kurzgeschlossenen Zustand beträgt er 0,78 (SD 0,07, $n = 7$), mit 15 min 0,72 (SD 0,14, $n = 5$). Die geringe Differenz ist nicht signifikant ($p < 0,2$). Der größte Teil der Änderung des j_{12} im Vergleich zu den kurzgeschlossenen Bedingungen ist also bereits nach 1 min abgeschlossen. Der geringe Abfall zwischen der 1. und 15. Minute (0,4%/min) ist im Vergleich zum Effekt in der 1. min (27%/min) sehr gering.

3. j_{12} und SCC bei der Transportinhibition durch Kälte

Die Versuche wurden in einem Kälteraum bei Temperaturen von 0 bis 1° C durchgeführt. Es wurde gewartet, bis sich die Häute bezüglich ihres SCC im steady state befanden (2 h). Als Vergleich dienten Kontrollversuche, die bei Zimmertemperatur an gleichen Stücken derselben Häute gleichzeitig durchgeführt wurden.

Abbildung 29 zeigt einen Einzelversuch. Die Aufnahmegerade verläuft bei 0° C wesentlich flacher als bei dem gleichzeitig durchgeführten Versuch mit einem seitensymmetrisch gleichen Stück derselben Froschhaut bei 26° C. Der aus der Steigung der Aufnahmegeraden in diesen Versuchen errechnete

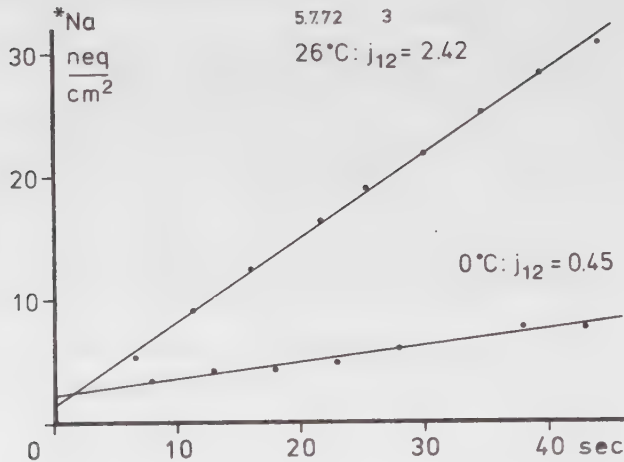


Abb. 29: Aufnahmegeraden von seitensymmetrisch gleichen Teilen der isolierten Bauchhaut eines Frosches. Die Natriumaufnahme der einen Hälfte wurde bei 0° C im Kälteraum bestimmt, die der anderen Hälfte bei 26° C. Die angegebenen Werte für den j_{12} sind aus den Regressionsgeraden (durchgezogene Linien) errechnet.

j_{12} beträgt 0,45 in der Kälte bzw. 2,42 $\mu\text{eq}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$ in der Kontrolle.

Im Mittel von 10 Paarversuchen sinkt der SCC von 1,8 $\mu\text{eq}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$ (SD 0,70) in der Kontrolle auf 0,24 $\mu\text{eq}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$ (SD 0,05) in der Kälte ab. Der j_{12} vermindert sich in denselben Versuchen von 1,85 (SD 0,72) auf 0,28 $\mu\text{eq}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$ (SD 0,17). Die Abnahme des SCC in der Kälte auf 1/8 entspricht einem Q_{10} von 2,3, die Abnahme des j_{12} auf 1/7 einem Q_{10} von 2,1.

Der j_{21} beträgt in der Kälte 0,034 $\mu\text{eq}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$. Für die Abbildungen 27 und 28 wurde dieser j_{21} verdoppelt, um ihn

mit den bei Zimmertemperatur gewonnenen Werten vergleichen zu können (Ausgleich der erniedrigten Diffusibilität des Natrium-Ion und der erhöhten Viskosität des Wassers bei $0 - 1^{\circ} \text{C}$ (72)).

4. j_{12} und SCC bei Transportinhibition mit Amilorid

Üblicherweise wurde - nachdem die Haut im Vorlauf einen konstanten SCC erreicht hatte (Kontroll-SCC) - die Ringerlösung der epithelialen Halbkammer gegen eine amiloridhaltige (10^{-4} M) Ringerlösung ausgetauscht. Die j_{12} -Bestimmung wurde nach 20 min Inkubation mit Amilorid durchgeführt, wobei die epitheliale Testlösung ebenfalls 10^{-4} M Amilorid enthielt.

Tabelle 3: Zusammenstellung der Ergebnisse mit Amilorid 10^{-4} M in der epithelialen Badelösung.

Versuche im steady state.

	SCC	j_{12}	j_{21}	Quotient
Kontrolle	1.113	1.18*	0.07*	1.06*
SEM	0.124			
Amilorid	0.056	0.163	0.106	3.1
SEM	0.010	0.041	0.042	

Die Werte sind Mittel aus $n = 11$ Versuchen.

SCC, j_{12} und j_{21} sind in $\mu\text{eq}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$ angegeben.

*Diese Werte entsprechen einem Vergleichskollektiv unter Kontrollbedingungen.

Amilorid inhibierte in diesen Versuchen den SCC und den j_{12} nahezu vollständig. Der inhibierte SCC betrug im Mittel von 11 Versuchen 5,5% (SD: 3,8%) des Kontroll-SCC.

Der j_{12} sinkt gegenüber der Kontrolle auf 13,7% (SD 11,7%) ab. (Die Prozentangaben sind Mittel aus den prozentualen Inhibitionen bei den Einzelversuchen). Der in diesen Versuchen bestimmte mittlere j_{21} von $0,106 \mu\text{eq}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$ ist vom Mittelwert der Kontrollversuche ($0,07 \mu\text{eq}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$) nicht signifikant verschieden.

In einigen Einzelversuchen wurde die epitheliale Seite der Haut erst während des Flutens mit der Amiloridhaltigen Ringerlösung in Kontakt gebracht. Bei einer Amiloridkonzentration von 10^{-4} M zeigte sich innerhalb der Versuchszeit (50 sec) eine zunehmende Inhibition der Natriumaufnahme. Die Steilheit der Aufnahmekurve nahm mit zunehmender Kontaktzeit ab.

Versuche, die in gleicher Weise, aber mit einer höheren Amiloridkonzentration durchgeführt wurden, zeigten dasselbe Ergebnis wie die Versuche mit 10^{-4} M Amilorid unter steady state-Bedingungen. Der SCC und der j_{12} (s. Tab. 4, Zeile 1) werden bis auf wenige % des Kontrollwertes reduziert. Die Natriumaufnahme war in den einzelnen Hautstücken gering und zeigte einen geringen linearen Anstieg mit der Zeit. Tabelle 4 enthält außerdem die Ergebnisse von 2 Versuchsserien, in denen die Natriumaufnahme ebenfalls bei 10^{-3} M Amilorid in der Testlösung bestimmt wurde. Die Transportleistung war im Vorlauf einmal durch Verminderung der Natriumkonzentration in der Badelösung (Zeile 2) und zum anderen durch Gabe von Amilorid (10^{-4} M) inhibiert worden (Zeile 3).

Der auf diese Weisen bestimmte SCC und j_{12} unterscheiden sich nicht wesentlich von den Versuchen ohne Transportinhibition im Vorlauf (Zeile 1).

5. j_{12} und SCC bei Transportinhibition mit Strophantin

Nachdem die Haut im Vorlauf einen konstanten SCC erreicht hatte (Kontroll-SCC), wurde die Ringerlösung der corialen Halbkammer gegen eine strophantinhaltige (10^{-4} M) Ringer-

Tabelle 4: Zusammenstellung der Ergebnisse mit Amilorid 10^{-3} M in der epithelialen Testlösung

Bedingungen im Vorlauf	Vorlauf		Fluten		n
	K-SCC	SCC	SCC	j_{12}	
110/110	1.27		0.10	0.13	5
110/110 $\rightarrow$ 0/0	1.75 $\rightarrow$	0.02	0.14	0.27	4
110/110 $\rightarrow$ 110+Am 10^{-4} M/110	2.08 $\rightarrow$	0.12	0.12	0.17	4

SCC und j_{12} in $\mu\text{eq}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$.

Die Kurzbezeichnung der Versuchsbedingungen (z.B. 110/110) gibt oberhalb des Bruchstrichs die Natrium- und Amiloridkonzentration der epithelialen Badelösung und unterhalb die Natriumkonzentration der corialen Badelösung an.

Beim Fluten bei allen Versuchen: 110* + Am 10^{-3} /110.

K-SCC = Kontroll-SCC.

lösung ausgetauscht. Die j_{12} -Bestimmung wurde nach 60 - 90 min Inkubation durchgeführt.

Strophantin inhibierte in 10 Versuchen den SCC durchschnittlich um 94,5% auf 5,5% (SD 4,1%) des Kontroll-SCC (s. Tab. 5). Der j_{12} sinkt dagegen nur auf 16,3% (SD 12,7%) des Vergleichswertes ab. (Die Prozentangaben sind Mittel aus den prozentualen Inhibitionen bei den Einzelversuchen). Die unterschiedliche prozentuale Inhibition von SCC und j_{12} ist signifikant ($p < 0,01$). Der j_{21} liegt im Mittel dieses Kollektivs bei $0,121 \mu\text{eq}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$. Er ist vom Mittelwert der Kontrollversuche ($0,07 \mu\text{eq}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$) nicht signifikant verschieden. Eine Sofortwirkung von Strophantin, d.h. eine Wirkung bei Applikation von Strophantin erst zusammen mit den Testlösungen konnte nicht beobachtet werden.

Tabelle 5: Zusammenstellung der Ergebnisse mit Strophantin 10^{-4} M in der corialen Badelösung.

Versuche im steady state

	SCC	j_{12}	j_{21}	Quotient
Kontrolle	1.01	1.08*	0.07*	1.07*
SEM	0.07			
Strophantin	0.056	0.177	0.121	3.2
SEM	0.013	0.043	0.042	

Die Werte sind Mittel aus $n = 10$ Versuchen.

SCC, j_{12} und j_{21} sind in $\mu\text{eq}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$ angegeben.

*Diese Werte entsprechen einem Vergleichskollektiv unter Kontrollbedingungen.

6. j_{12} und SCC bei niedriger Natriumkonzentration

In einer weiteren Versuchsreihe wurde der j_{12} bei Natriumkonzentration von 10 meq/l unter steady state-Bedingungen gemessen (Tab. 6).

Tabelle 6: Zusammenstellung der Ergebnisse mit 10er-Ringer in beiden Badelösungen.

Versuche im steady state

	SCC	j_{12}	j_{21}	Quotient
Kontrolle*	1.11	1.18	0.07	1.06
10er-Ringer	0.58	0.58	0.008	1.005
SEM	0.085	0.086	0.022	0.038

Die Werte sind Mittel aus $n = 13$ Versuchen.

SCC, j_{12} und j_{21} sind $\mu\text{eq}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$ angegeben.

*Diese Werte entsprechen einem Vergleichskollektiv unter Kontrollbedingungen.

Das relativ geringe Absinken des SCC gegenüber Versuchen mit 110er-Ringer entspricht den Beobachtungen von Cereijido (11). Inwieweit das relativ geringe Absinken des SCC bei niedriger Natriumkonzentration auf den Ersatz des Natriums durch Cholin zurückzuführen ist, bleibt unsicher (33, 64a).

Der j_{12} und der SCC liegen im Mittel bei $0,58 \mu\text{eq}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$. Der Quotient ergibt sich im Mittel zu $1,005$ (SEM $0,038$, $n = 13$) und liegt damit unter dem mittleren Quotienten der Kontrollversuche ($1,07$). Der j_{21} beträgt $0,008 \mu\text{eq}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$ (SEM $0,022$), eine Größenordnung unter dem Wert bei Normalbedingungen. Der mittlere Intercept der Aufnahmeggeraden beträgt mit $0,77 \text{ neq}/\text{cm}^2$ (SEM $0,2$) nur einen Bruchteil ($= 1/8$) des Intercept beim Vergleichskollektiv ($6,0 \text{ neq}/\text{cm}^2$), vergl. Abbildung 30. Der Absolutfehler der j_{12} -Einzelbestimmung ($0,09 \mu\text{eq}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$) liegt unter dem der Kontrollversuche bei 110er-Ringer ($0,19 \mu\text{eq}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$).

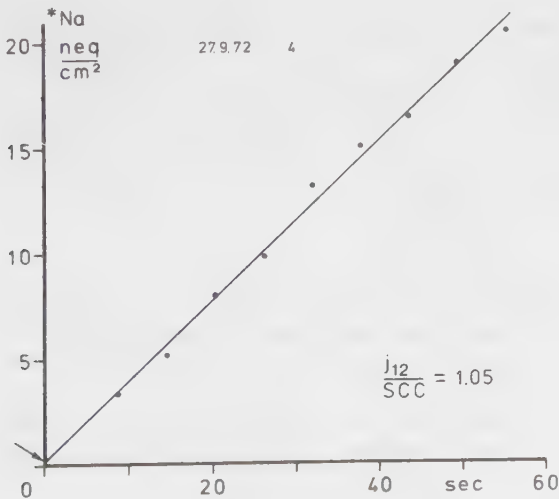


Abb. 30: Aufnahmeggerade bei einem Versuch mit 10er-Ringer auf beiden Seiten der Haut (Versuch im steady state). Der Pfeil bezeichnet den Ordinatendurchgang der Regressionsgeraden (= Intercept).

Im Folgenden werden Versuche beschrieben, in denen mit der Flutmethode der Natrium-Transportpool auf zwei verschiedene Weisen bestimmt werden konnte.

7. Natrium-Transportpool am isolierten Epithel der Froschhaut

Es wurden 22 Versuche mit dem isolierten Epithel der Froschhaut durchgeführt. Die Versuche wurden in derselben Weise wie die Kontrollversuche an der Gesamthaut durchgeführt.

Bei den Versuchen mit dem isolierten Epithel der Froschhaut läßt sich innerhalb der üblicherweise gewählten Versuchszeiten (30 - 60 sec) bereits eine Sättigung der Natriumaufnahme aus der epithelialen Badelösung beobachten. Abbildung 31 zeigt einen derartigen Versuch.

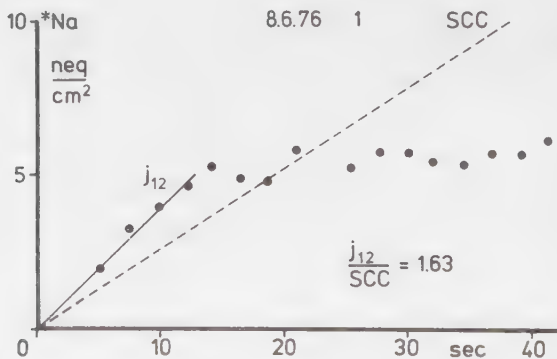


Abb. 31: Natriumaufnahme des isolierten Epithels einer Froschhaut in Abhängigkeit von der Kontaktzeit. Die Natriumaufnahme zeigt nach 20 sec einen Sättigungswert (HWZ = 8,6 sec).

Die durchgezogene Linie zeigt die anfängliche Steigung der Natriumaufnahmekurve (= j_{12}). Die unterbrochene Linie gibt die aus dem SCC zu errechnende Natriumnettoaufnahme der Haut an.

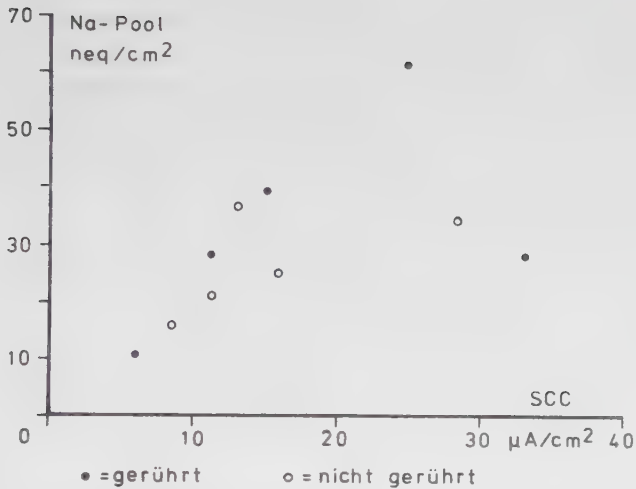


Abb. 32: Abhängigkeit der am isolierten Epithel mit der Flutmethode bestimmten Transportpoolgrößen vom zugehörigen SCC.

In 5 Versuchen wurde die Lösung der corialen Halbkammer gerührt, um das auf der Basalseite des isolierten Epithels befindliche Tracer-Natrium schneller zu entfernen.

Der Sättigungswert der Natriumaufnahme (in Abb. 31 $5,4 \text{ neq}/\text{cm}^2$) kann nach Gleichung (2) als Natrium-Transportpool bezeichnet werden. Abbildung 31 zeigt, daß die Natriumaufnahme bereits nach 20 sec geringer ist als der Nettonatriumtransport (SCC).

In einer Reihe von 10 Vorversuchen ergaben sich Transportpoolgrößen von $10 - 70 \text{ neq}/\text{cm}^2$. Bei diesen Versuchen zeigte sich eine Abhängigkeit der so bestimmten Transportpoolgrößen von dem SCC der Haut (dargestellt in Abb. 32). Nach einer Änderung der Präparationstechnik (längeres Einwirken von Trypsinlösung und engmaschiges Einritzen des Coriums)

ging diese Abhängigkeit verloren. Die Transportpoolgrößen variierten in 12 Versuchen von 5,4 bis 19 neq/cm². Im Mittel ergab sich 12,0 neq/cm² (SD 4,0). Unter der Voraussetzung, daß der mittlere Intercept unter Kontrollbedingungen (2,4 neq/cm²) dem extracellulär gelegenen Tracer-Natrium entspricht (s. III) 6.5.2.), beträgt der Natriumtransportpool nur 9,6 neq/cm². Die Halbwertszeit, mit der der Pool aufgebaut wurde, variierte von 8 bis 22 sec.

Der SCC der isolierten Epithelien ist gegenüber dem der Gesamthaut um etwa 30% reduziert (0,81 µeq/cm² · h). Dies könnte auf eine gegenüber der Gesamthaut stärkere Dehnung des isolierten Epithels zurückzuführen sein, da die stützende Funktion des corialen Bindegewebes fehlt.

Der Widerstand des isolierten Epithels (385 Ω · cm², SD 390) sinkt im Vergleich zur Gesamthaut (2274 Ω · cm², SD 1492) signifikant ab. (p < 0,0005). Den niedrigen Widerständen entsprechend steigen die passiven Natriumflüsse j₂₁ und j₃₁ stark an. Der Quotient j₁₂/SCC des in Abbildung 31 dargestellten Versuchs war 1,68, was einem j₂₁ von 0,61 µeq/cm² · h entspricht. Der Widerstand dieses Epithels war entsprechend niedrig (100 Ω · cm²). Der j₂₁ steigt also proportional zur erhöhten Leitfähigkeit des Epithels (10 mS/cm²) an. Bei j₃₁-Bestimmungen zeigte der transepitheliale (passive) Natrium-Efflux eine entsprechende Erhöhung wie der j₂₁. Abbildung 33 zeigt einen derartigen Versuch: Der j₃₁ des isolierten Epithels ist gegenüber dem Vergleichswert an der Gesamthaut etwa zehnfach erhöht (0,43 µeq/cm² · h). Der steile Anstieg des j₃₁ nach der 6. min in diesem Versuch wurde von einem Abfall des Spontanpotentials der Haut begleitet. An isolierten Epithelien, die einen derartigen Abfall des Potentials in der Vorperiode zeigten, wurden keine Poolbestimmungen durchgeführt. Da dieser Effekt von der Versuchsdauer abzuhängen schien, wurden die Vorlaufzeiten gegenüber den Experimenten an der Gesamthaut auf 20 min verkürzt.

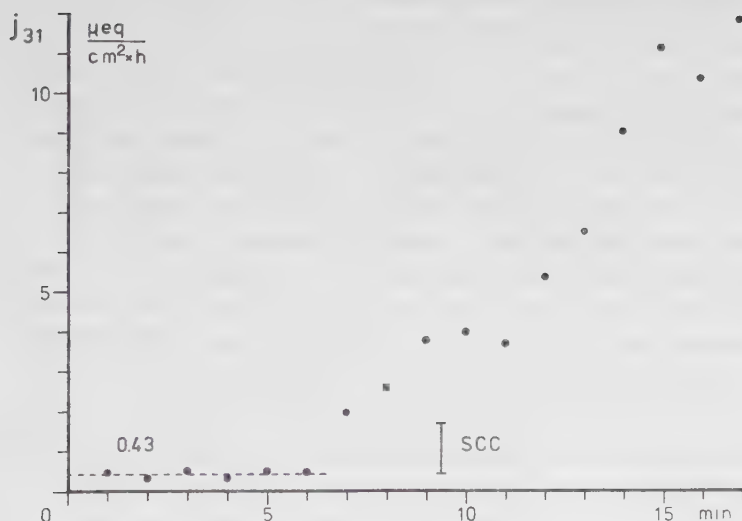


Abb. 33: j_{31} -Bestimmung an einem isolierten Froschhautepithel. Der gleichzeitig bestimmte SCC ($1,3 \mu\text{eq}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$) ist zum Vergleich der Flußgrößen mit eingezeichnet). Ab der 7. min steigt der j_{31} stark an. Makroskopisch war ein Defekt im Epithel nicht zu beobachten. Die j_{31} -Bestimmung wurde nach 40 min Vorlauf durchgeführt.

8. Natriumaufnahme der Gesamthaut nach Langzeitinkubation in natriumfreier Ringerlösung

In einem Vorlauf wurde der Kontroll-SCC der Häute bestimmt. Anschließend wurde ein Probelauf durchgeführt, um den differentiellen SCC der Haut zu erhalten. Danach wurden die Badelösungen gegen Lösungen mit niedriger Natriumkonzentration ausgetauscht (üblicherweise 0 meq Na/l). Dieser Austausch wurde mehrfach wiederholt. Nach 60 - 120 min wurde

die Natriumaufnahme durch Fluten mit den üblichen Testlösungen ($110^*/110$) durchgeführt.

Nach langzeitiger Inkubation mit natriumfreien Badelösungen sinkt der SCC auf nahezu 0 ab. In einigen Fällen lassen sich sehr kleine negative Kurzschlußströme beobachten, die auf einen geringen aktiven Chloridtransport hinweisen (89, 30, 76). Wird die Haut anschließend wieder in normaler Ringerlösung gebadet, steigt der SCC momentan auf Werte an, die über dem Kontroll-SCC liegen. Im weiteren Verlauf sinkt der SCC auf einen steady state-Wert ab. Dieser Effekt läßt sich qualitativ auch dann noch nachweisen, wenn die Transportleistung der Haut durch Strophantin gehemmt wurde (eigene Beobachtung und Erlij, pers. Mitteilung).

Mit unserer Versuchsanordnung war es möglich, das zeitliche Verhalten der Natriumaufnahme und gleichzeitig den SCC-Verlauf in der Phase nach dem Wechsel von natriumfreier zu Ringerlösung mit normaler (110 meq/l) Natriumkonzentration zu beobachten. Die SCC-Schreibung beim Fluten ist dabei ein Resultat zweier sich überlagernder Vorgänge: Einerseits steigt der SCC an, da immer größere Anteile der Haut kurzgeschlossen werden, andererseits fällt der SCC der bereits kurzgeschlossenen Anteile der Haut entsprechend dem oben beschriebenen SCC-Verlauf, der nach einem Wechsel von 0 auf 110 meq Na/l in der Badelösung auftritt, ab.

Die Differenzierung der beiden Vorgänge wird dadurch erschwert, daß die Inhomogenitäten der örtlichen SCCs sich ebenfalls in der SCC-Schreibung auswirken. Mit Hilfe eines Rechenverfahrens war es jedoch möglich, aus der SCC-Schreibung den zeitlichen Verlauf des SCC nach dem Wechsel der Badelösung zu extrapolieren. Dieser Verlauf entsprach der SCC-Schreibung, die man erhalten konnte, wenn die beiden Kammerhälften nach Vorinkubation in natriumfreien Lösungen schlagartig mit 110er-Ringer gefüllt wurden.

Die Versuche gingen von der Tatsache aus, daß die Froschhaut nach langer Inkubation in natriumfreier Lösung kaum

noch Natrium aufweist. Sollte es nun einen nennenswert grossen Transportpool in der Haut geben, müßte er, wenn man die Haut wieder in normaler Ringerlösung badet, aufgefüllt werden.

Neben dem aufgenommenen Natrium, das die Haut transzellulär passiert, und damit im SCC zu sehen ist, sollte es Natrium geben, das von der Haut aufgenommen wird, um den Pool aufzufüllen, also nicht im SCC sichtbar wird. (Die Relativierung und Präzisierung dieser These erfolgt bei V) 3.). Wir haben daher in diesen Versuchen von der aufgenommenen Natriummenge die aus der SCC-Schreibung zu entnehmende Nettoladungsverschiebung über die Haut subtrahiert. Dieses über die Nettoladungsverschiebung hinaus in die Haut eingeströmte Natrium zeigte einen charakteristischen Zeitverlauf. Innerhalb der Versuchszeit (60 sec) erreicht es einen Sättigungswert.

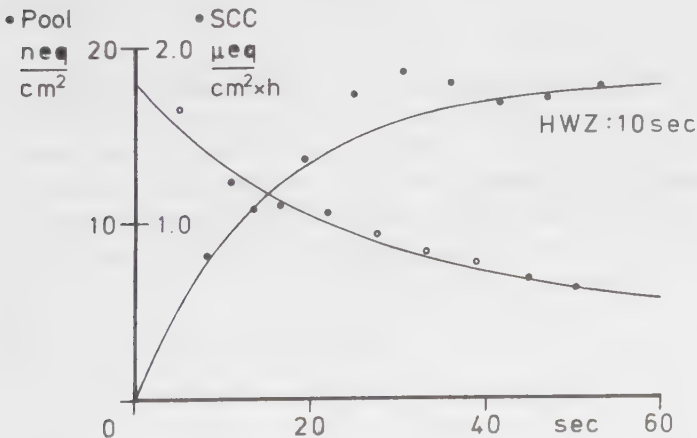


Abb. 34: SCC-Verlauf (Kreise) und Poolaufbau (Punkte) im Mittel von 16 Versuchen. Erläuterung der Versuchsdurchführung und Berechnung der Poolgröße s. Text.

Abbildung 34 zeigt eine Zusammenfassung von 16 Versuchen. Die über den SCC hinausgehende Natriumaufnahme erreichte mit einer Halbwertszeit von 10 sec einen Sättigungswert von ca. 18 neq/cm^2 (gefüllte Kreise). Entsprechende Versuche mit Vorinkubation in 10er-Ringer ergaben mit 15 neq/cm einen etwas kleineren Pool. Die Halbwertszeit des Poolaufbaus war mit 14,7 sec etwas länger. Die in den Einzelversuchen errechneten Poolgrößen variierten beträchtlich. Sie reichten von 0 neq/cm^2 bis 40 neq/cm^2 . Wieweit diese Variation eine echte Variation der Poolgrößen darstellt, oder ob sie auf stochastische Meßfehler in dem Bestimmungsverfahren zurückzuführen ist, die z.T. durch die Inhomogenitäten des biologischen Objektes bedingt sind, ließ sich nicht sicher ermitteln.

In Abbildung 34 ist der gleichzeitig bestimmte Verlauf des SCC nach dem Wechsel der Badelösungen eingetragen (offene Kreise). Er sinkt während des Poolaufbaus ausnahmslos ab, bei den Versuchen nach Vorinkubation mit 10er-Ringer jedoch in geringerem Maße.

Der Poolaufbau ist im Wesentlichen nach 30 sec abgeschlossen. Die nahezu Identität von SCC und j_{12} war nach 1 min wieder erreicht. Die aus Abbildung 34 ersichtliche Abweichung der Natriumaufnahme von der idealisierten Kurve bei den mittleren 3 Werten trat in der Mehrzahl der Versuche auf. Die Ursache für diese Abweichung konnte nicht sicher ermittelt werden.

V) DISKUSSION

1. Beziehung zwischen j_{12} und SCC (Variationsanalyse)

Im Folgenden wird die Variation des j_{12} im Verhältnis zum SCC diskutiert. Die weitgehende Covariation der beiden Größen erlaubt es, für die Zusammenstellung der Ergebnisse aus einer Versuchsserie den Quotienten j_{12}/SCC des Einzelversuches als charakteristische Größe zu verwenden.

Das Verfahren der SCC-Korrektur (s. III) 6.5.1.) beruhte auf der Beobachtung, daß j_{12} und SCC innerhalb einer Haut eine direkte Proportionalität aufweisen. Es läßt sich zeigen, daß diese Beziehung auch für j_{12} und SCC an verschiedenen Häuten gilt, insbesondere wenn es sich um Bestimmungen unter gleichen Versuchsbedingungen bei homogenen Kollektiven (gleiche Froschart, gleiche Jahreszeit) handelt. Tabelle 7 demonstriert dies am Beispiel zweier jeweils in sich homogener Versuchskollektive (Kontrollbedingungen).

Tabelle 7: Versuche unter Kontrollbedingungen mit und ohne SCC-Korrektur.

	Mittelwert	SD	% Fehler
SCC ($\mu\text{eq}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$)	0.85	0.39	45
j_{12} ($\mu\text{eq}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$)	0.90	0.56	62
Quotient	1.06	0.37	35
SCC ($\mu\text{eq}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$)	1.80	0.69	38
j_{12} ($\mu\text{eq}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$)	1.85	0.72	39
Quotient	1.03	0.11	10

Die obere Hälfte der Tabelle entspricht einem Versuchskollektiv von 23 Häuten unter Kontrollbedingungen. Auswertung ohne SCC-Korrektur.

In der unteren Hälfte sind die Ergebnisse eines Versuchskollektivs ($n = 10$) unter Kontrollbedingungen angegeben, bei dem die SCC-Korrektur angewendet wurde.

Bei voneinander unabhängiger Variation des j_{12} und SCC müßte aus den Relativfehlern beider Größen ein Fehler des Quotienten von 70% (ohne SCC-Korrektur) bzw. 54% (mit SCC-Korrektur) resultieren. Gemessen wurde jedoch eine Variation des Quotienten von 35% bzw. 10%. Beide Größen (j_{12} , SCC) sind also weitgehend direkt korreliert. Die Art dieser Korrelation bei spontan unterschiedlichen und durch Transportinhibition reduzierten Transportleistungen wird in Abbildung 28 dargestellt. Sie läßt sich mit der Gleichung $j_{12} = \text{SCC} + 0,07$ gut beschreiben.

Das gleichartige Verhalten von j_{12} und SCC unter den verschiedenen angewandten Bedingungen der Transportinhibition ist aus Abbildung 35 zusammenfassend ersichtlich.

Gegenstand der Variationsanalyse ist im Weiteren die mit dem Fehler des Quotienten bestimmte Abweichung von der nahezu 1:1-Beziehung beider Größen in den Einzelbestimmungen. Diese Variation läßt sich auf zweierlei Weise interpretieren:

- Die Variation des SCC entspricht der zugrunde liegenden Variation der Transportleistungen verschiedener Häute. Der j_{12} ist weitgehend abhängig vom SCC, variiert aber etwas relativ zu ihm (kenntlich am Fehler der Quotienten)
- und vice versa.

Nur die erste Möglichkeit steht mit den Daten in Tabelle 7 in Einklang. Die Variation der Grundgröße SCC = 45% und die Variation des Quotienten = 35% ergeben nach der Fehlerfortpflanzung 58% (gemessene Variation des j_{12} = 62%). In Analogie für die SCC-korrigierten Werte des zweiten Kollektivs: 38% + 10% ergibt 39% (gemessen = 39%). Die im Fehler des Quotienten ersichtliche Variation der beiden Größen zueinander beruht demnach auf einer Variation des j_{12} relativ zum SCC.

Die Frage stellt sich, ob diese Variation des j_{12} im Verhältnis zum SCC eine echte Variabilität darstellt oder weitgehend ein Resultat der bei der j_{12} -Bestimmung auf-

tretenden Bestimmungsfehler ist. Eine echte Variabilität des j_{12} relativ zum SCC ist bei konstanten Versuchsbedingungen, wie zwei Ergebnisdaten zeigen, nicht wahrscheinlich. Bei den Versuchen mit Normalbedingungen ergibt sich der Quotient im Mittel zu 1,07. Die Quotienten in den Einzelversuchen sind um diesen Mittelwert in etwa normal verteilt mit einer SD von 0,1 (SCC-Korrektur). Da j_{12} trivialerweise $\geq$ SCC ist, kann die beobachtete SD nur zu einem geringen Teil einer echten Variabilität des j_{12} relativ zum SCC entsprechen. Bei den Versuchen mit niedriger Natriumkonzentration (10 meq Na/l) ergibt sich der Quotient im Mittel zu 1,005. Die Quotienten der Einzelversuche verteilen sich mit einer SD von 0,14 zu gleichen Teilen unter und über 1. Da diese Versuche im steady state durchgeführt wurden, gilt auch hier $j_{12} \geq$ SCC, so daß praktisch die gesamte beobachtete Variation des Quotienten auf einen stochastischen Fehler in der j_{12} -Bestimmung zurückgehen muß.

Die nach der SCC-Korrektur verbleibende Variation des Quotienten in der Einzelmessung (10% bei homogenen Kollektiven) geht jedoch über den Fehler hinaus, der auf Grund von Meßfehlern bei der Bestimmung des SCC, der Traceraufnahme der Haut C_s , der Kontaktzeit t_s und der spezifischen Aktivität p_1 resultieren könnte (bis 4%, s. III) 7.).

Eine Analyse der Fehler, die auf Grund der Inhomogenitäten des biologischen Objektes bei der j_{12} -Bestimmung entstehen, zeigt, daß sie im Wesentlichen den Fehler des Quotienten begründen. Die Errechnung des j_{12} aus den Traceraufnahmen der einzelnen Hautstücke beruht auf der Annahme gleicher örtlicher SCCs und gleicher Mengen an nicht-zellulärem Natrium (s. III) 6.4.). Inhomogenitäten des j_{12} innerhalb einer Haut wirken sich auf die Traceraufnahme proportional zur Kontaktzeit (t_s) aus, ungleiche $^*Na_{ECRs}$ bewirken einen Absolutfehler:

$$C_s = j_{12} \cdot t_s \cdot p_1 + \cdot Na_{ECR} \cdot p_1 \quad (13)$$

Der j_{12} -Bestimmungsfehler auf Grund der an einer Haut örtlich unterschiedlichen Transportleistungen konnte mit dem SCC-Korrekturverfahren weitgehend eliminiert werden. Im Prinzip werden bei diesen Verfahren die örtlichen Natriumaufnahmen bereits auf den örtlichen SCC bezogen, so daß der ermittelte Quotient durch das Korrekturverfahren nicht systematisch beeinflußt wird. Die Einführung der SCC-Korrektur beruhte auf der Beobachtung, daß die örtlichen SCCs und die entsprechenden für jedes Hautstück einzeln nach Gleichung (11) ermittelten örtlichen j_{12} ein gleiches Verteilungsmuster aufweisen. Die Ergebnisse zeigen, daß die Proportionalität in einem weiten Bereich unterschiedlicher Transportleistungen (s. Abb. 28) gültig ist. Das Korrekturverfahren bringt in der Einzelbestimmung eine beträchtliche Reduzierung der Streuung der einzelnen Meßpunkte (s. Abb. 20), die Variation des Quotienten wird dadurch stark verringert. Daher ergeben schon relativ kleine Versuchsreihen ($n = 10$) mit der SCC-Korrektur verlässliche Mittelwerte (SEM 3%), die sich ohne Korrektur erst mit großen Versuchskollektiven mit gleicher Verlässlichkeit bestimmen lassen. Bei der Analyse der differentiellen Kurzschlußstromleistungen der einzelnen Häute zeigten sich alle erdenklichen Profile. Im Mittel ließ sich jedoch eine systematische Verteilung nicht nachweisen, so daß die beobachtete Identität der Mittelwerte der Versuchsreihen mit und ohne Anwendung des Korrekturverfahrens zu erwarten ist.

Die mit der Anwendung des Korrekturverfahrens verbliebene geringe Variation des j_{12} im Verhältnis zum SCC entspricht der Größe und dem Verhalten nach einem Bestimmungsfehler des j_{12} , der auf Inhomogenitäten des Na_{ECR} innerhalb einer Haut zurückzuführen ist. Ein derartiger Fehler wirkt sich nach Gleichung (13) als Absolutfehler in der C_s -Bestimmung aus. Bei nicht zufälliger Verteilung innerhalb

einer Haut (s. Abb. 22) bewirkt dieser Fehler einen Absolutfehler bei der Bestimmung des j_{12} aus der Steigung der Regressionsgeraden. Der mit SCC-Korrektur erhaltene Fehler des Quotienten zeigt die Charakteristik eines derartigen Absolutfehlers:

Bei Transportinhibition durch Kälte sinkt der SCC im Mittel auf 1/8 des Wärmewertes, der j_{12} auf 1/6 (Paarversuche). Die Variation des j_{12} im Verhältnis zum SCC liegt in der Wärme bei 10% (SD), in der Kälte bei 56%, also 5,6mal höher. Die Absolutfehler (bezogen auf die Gesamtflutzeit t_g) sind aber nahezu identisch 2,3 neq/cm² bzw. 2,2 neq/cm². Der nach der SCC-Korrektur verbliebene Fehler des Quotienten (10% bzw. 56%) beruht somit auf einem relativ konstanten Absolutfehler bei der j_{12} -Bestimmung. Dieser Absolutfehler entspricht auch in der Größenordnung dem zu erwartenden Absolutfehler auf Grund unterschiedlich großer $\cdot Na_{ECRs}$. Bei einem mittleren Intercept von 2,4 neq Na/cm² (= Schätzung des mittleren $\cdot Na_{ECR}$) ist eine Variation des $\cdot Na_{ECR}$ von $\pm 1,5$ neq Na/cm² zu erwarten (vergl. Abb. 23). Sie entspricht dabei in der Grösse dem beobachteten Absolutfehler.

Der auf eine Ungleichverteilung des Na_{ECR} innerhalb einer Haut zurückzuführende Absolutfehler bei der j_{12} -Bestimmung sollte bei Verwendung niedrigerer Natriumkonzentrationen entsprechend absinken. Tatsächlich ergibt sich bei den Versuchen mit 10 meq [Na] ein (wiederum auf die Gesamtflutzeit bezogener) Fehler von 1,2 neq gegenüber 2,5 neq der zugehörigen Kontrollversuche bei 110 meq [Na].

Zusammenfassend läßt sich somit sagen: Bei konstanten Versuchsbedingungen ist eine echte Variation des j_{12} im Verhältnis zum SCC nicht notwendig anzunehmen. Der nach der SCC-Korrektur verbliebene geringe Fehler des Quotienten beruht wahrscheinlich auf einem Bestimmungsfehler des j_{12} auf Grund einer Ungleichverteilung des $\cdot Na_{ECR}$ innerhalb einer Haut. Der Fehler wird jedoch auf Grund

des Abspritzverfahrens sehr klein gehalten (III) 6.4.1.). Es wurde darauf geachtet, daß er sich nicht systematisch auswirken konnte (III) 6.5.2.).

Systematische Änderungen des Quotienten in Abhängigkeit von den verschiedenen Versuchsbedingungen sind aus Abbildung 27 ersichtlich. Sie beruhen darauf, daß selbst bei grundsätzlich unterschiedlichen Versuchsbedingungen die Differenz zwischen j_{12} und SCC im wesentlichen konstant bleibt. Bei niedrigen Kurzschlußstromleistungen ergeben sich daher höhere Werte für den Quotienten aus j_{12} und SCC.

2. Natriumflüsse über die äußere Barriere bei Kontrollbedingungen und Variation der Transportleistung

In Abbildung 35 sind die j_{12} und SCC-Bestimmungen, die an der Gesamthaut im steady state unter Kontrollbedingungen und nach Inhibition des transezellulären Natriumtransportes gewonnen wurden, zusammengefaßt. Die kalkulierten Werte für den j_{21} sind ebenfalls in der Abbildung enthalten.

Unter der Voraussetzung, daß die Differenz der unidirektionalen transepithelialen Natriumflüsse ($j_{13} - j_{31}$) mit dem SCC identisch ist (82), läßt sich unter Flußgleichgewichtsbedingungen allgemein ableiten, daß der SCC auch der Differenz der unimembranal unidirektionalen Einzelflüsse über jede der Barrieren entspricht. Für die äußere Barriere gilt demnach:

$$\text{SCC} = j_{12} - j_{21} \quad \text{bzw.} \quad j_{21} = j_{12} - \text{SCC} \quad (14)$$

Die Angaben für den j_{21} in Abbildung 35 wurden nach dieser Bestimmungsgleichung kalkuliert.

Die Identität von Natriumnetttransport und SCC als Voraussetzung für die Interpretation der Differenz von j_{12} und SCC als j_{21} ist jedoch quantitativ nicht vollständig aufrecht zu erhalten. Die Bauchhaut der verwendeten Frösche zeigte nach Langzeitinkubation in natriumfreien Cholin-Ringer-Lösungen teilweise negative Kurzschlußstromleistungen. Bei gleichzeitiger Inhibition mit Strophantin war dies noch ausgeprägter zu beobachten: Der negative SCC reichte bis 5% des Kontroll-SCC. Dieser Befund könnte darauf hinweisen, daß neben Natriumionen auch andere Ladungsträger transportiert werden. An einigen Froschspecies ist ein aktiver Chlorideinwärtstransport (89, 30) und eine aktive H^+ -Ionensekretion (27) nachgewiesen worden. Für die isolierte Bauchhaut der von uns verwendeten *Ranae esculentae* konnte ein Chloridtransport nachgewie-

j_{12}	j_{21}	SCC	
1.07	0.07	1.00	Kontrolle
0.16	0.10	0.06	Amilorid, 10^{-4} M
0.18	0.12	0.06	Strophantin, 10^{-4} M
0.58	0.01	0.58	10er-Ringer
0.28	0.03	0.24	Kälte, 0°C
0.75	(0.18)*	—	offen*

Abb. 35: Zusammenstellung der j_{12} -Bestimmungen unter steady state-Bedingungen. Die Angaben für die Kontrolle und für die Versuche an der nicht kurzgeschlossenen Haut (= offen*) beziehen sich wegen der Vergleichbarkeit auf einen Kontroll-SCC von $= 1,00 \mu\text{eq}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$. Kontroll-SCC für die übrigen Angaben ist (v.o.: 1,1, 1,0, 1,1 und $1,8 \mu\text{eq}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$. Der angegebene j_{21} entspricht der Differenz von j_{12} und SCC (alle Werte sind gerundet!).

*Der angegebene j_{21} ist eine abgeschätzte Größe (aus j_{12} und der Differenz von j_{13} und j_{31} kalkuliert).

sen werden, der sich, zumindest bei Abwesenheit von Natrium in den Badelösungen, als negativer SCC auswirkt (76). Da der Chloridtransport und die H^+ -Ionensekretion den natriumabhängigen Kurzschlußstrom verringern könnten, muß der kalkulierte j_{21} als zu große Schätzung des wirklichen Natriumausstroms angesehen werden. Neben dem eigentlichen Ausstrom von Natrium über die äußere Barriere, j_{21} , setzt sich die errechnete Größe aus dem Nettochloridtransport ($j_{13}^{Cl} - j_{31}^{Cl}$) und der H^+ -Ionensekretion, soweit sie nicht durch eine gleichzeitige Anionenexkretion (HCO_3^- ?) elektrisch kompensiert wird, j_{21}^H , zusammen:

$$j_{12} - SCC = j_{21} + (j_{13}^{Cl} - j_{31}^{Cl}) + j_{21}^H \quad (15)$$

Der unter Kontrollbedingungen kalkulierte j_{21} beträgt durchschnittlich 7% des Kontroll-SCC bzw. $0,07 \mu\text{eq/cm}^2$ • h. Dieser Befund steht im Gegensatz zu den bisher in der Literatur angegebenen Werten für die Natriumflüsse an der äußeren Barriere (16, 75, 7, 5, 6, 19). Im Allgemeinen wurden große Austauschflüsse angegeben (s. Literaturübersicht): Die Angaben über den j_{21} reichen von 40% bis zu einigen hundert % des SCC. Hinweise dafür, daß der j_{21} relativ klein ist, ergaben bereits Auswaschversuche in unserem Labor (24): Beim Auswasch des von epithelial her aufgeladenen Transportpools nach beiden Seiten der Haut ergab sich ein Verhältnis der Tracerflüsse $*j_{21} : *j_{23}$ von 1 : 20 (Kontrollbedingungen).

Hinsichtlich seiner Herkunft läßt sich der j_{21} in 2 Komponenten zerlegen (s. Abb. 36):

- einen Natriumausstrom aus einem zellulären Kompartiment, j_{21}^c ,
- und einen Natriumausstrom direkt aus dem Interzellularraum, j_{21}^e .

Es läßt sich zeigen, daß unter Kontrollbedingungen (wie auch bei den meisten untersuchten Transportbedingungen)

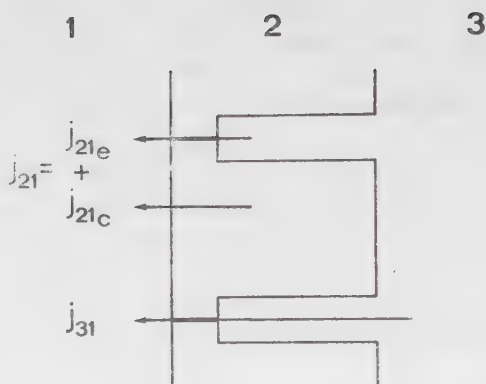


Abb. 36: Komponenten des j_{21} und transepithelialer Weg des j_{31} .

j_{21e} = extracelluläre Komponente

j_{21c} = celluläre Komponente (s. Text).

der j_{21} im Wesentlichen nur aus der extracellulären Komponente, j_{21e} , besteht.

Unter der Annahme, daß alle Natriumflüsse durch ein gemeinsames Kompartiment gehen (vergl. Abb. 2) gilt für die Verknüpfung von j_{21} und j_{31} :

$$j_{31} = j_{11} \times \frac{j_{32}}{j_{12} + j_{32}} \quad (16)$$

Auf Grund der relativ niedrigen Natriumpermeabilität der inneren Barriere (83, 58, 62) kann angenommen werden:

$j_{32} < j_{12}$. Aus obiger Beziehung (16) folgt dann: $j_{31} \ll j_{21}$. Diese Beziehung konnte in der vorliegenden Untersuchung nicht bestätigt werden. Berücksichtigt man, daß der kalkulierte j_{21} (7% des Kontroll-SCC) eher eine zu große Schätzung des tatsächlichen j_{21} ist (vergl. Gleichung (15)), so sind j_{21} und transepithelialer Efflux j_{31} (in

unserer Versuchsanordnung 3 - 7% des Kontroll-SCC) nahezu identisch. Dieses Ergebnis stützt daher die These, daß der transepitheliale Efflux zum großen Teil nicht über den ICR (bzw. das Transportkompartiment) läuft, sondern extracellulär über die intercellularen Spalten geht (84). Die extracelluläre Komponente des j_{21} ($= j_{21}^e$) müßte dann mindestens so groß sein wie der ebenfalls extracellulär verlaufende j_{31} (s. Abb. 36). (Wenn ein Anteil des Natriums in den Intercellularspalten von Kompartiment 1 her austauschbar ist, müßte der j_{21}^e größer als der j_{31} sein). Der zelluläre Anteil des j_{21} läßt sich ermitteln, indem man den extracellulären Anteil vom gesamten j_{21} abzieht. Da der j_{21}^e mindestens so groß ist wie der j_{31} , ergibt sich aus der angeführten Identität von j_{31} und j_{21} , daß ein cellulärer Anteil des j_{21} nicht nachzuweisen ist.

Die beobachtete Identität von j_{31} und j_{21} zeigt zudem, daß ein zusätzlicher Austauschfluß von Natrium an der äußeren Barriere entweder nicht vorhanden oder unmeßbar klein ist.

j_{12} und SCC sind unter Kontrollbedingungen nahezu identisch. Der j_{12} zeigt eine lineare Abhängigkeit von den spontan unterschiedlichen SCC-Leistungen (s. Abb. 28). Bei großen Kurzschlußstromleistungen nähert sich der Quotient aus j_{12} und SCC dem Wert 1 (s. Abb. 27), d.h. ihre prozentuale Abweichung wird sehr klein. Die Standardfehler des Quotienten aus j_{12} und SCC in den Einzelbestimmungen (10%) stellen vermutlich keine echte Variabilität des j_{12} im Verhältnis zum SCC dar, sondern sind auf Fehler in der Bestimmung des j_{12} zurückzuführen (s. V) 1.).

Der für Amilorid allgemein akzeptierte Wirkungsmechanismus, eine Erniedrigung der Permeabilität der passiven äußeren Barriere (2, 26, 6), stimmt mit der beobachteten Abnahme des j_{12} überein. Die bei Amilorid gegenüber der Kontrolle gemessene Konstanz des j_{21} kann jedoch durch diesen Wirkungsmechanismus nicht erklärt werden:

Der j_{21} müßte auf Grund der erniedrigten Permeabilität natürlich ebenfalls absinken. Die gemessene Konstanz des j_{21} entspricht dem unveränderten j_{31} unter dieser Bedingung (23).

Im Gegensatz zu Amilorid hemmt Strophantin den transzellulären Transport durch Inhibition des Na-K-ATPase-abhängigen aktiven Transportschrittes (89, 68, 54). Der Wirkungsort wird an der inneren Barriere des Systems angenommen. Strophantin wirkt daher auch nur bei coriumseitiger Applikation. Auf Grund dieses Wirkungsmechanismus sollte der Natriumeinstrom über die äußere Barriere nicht wesentlich absinken. (Eine Verminderung des unter nicht-inhibierten Bedingungen beobachteten geringfügig negativen Potentials über die äußere Barriere bei Kurzschlußbedingungen sollte eine geringfügige Hemmung des j_{12} bewirken können). Da bekannt ist, daß sich bei Strophantineinwirkung die zellulären Natrium- und Kaliumkonzentrationen an die extracellulären Konzentrationen in etwa angleichen, d.h. die Natriumkonzentration steigt stark an (68), wäre ein starkes Ansteigen des j_{21} zu erwarten. Die Ergebnisse zeigen jedoch, daß sich die Flüsse nach Strophantin genauso wie nach Amilorid verhalten (s. Abb. 35): Der j_{12} sinkt wie der SCC stark ab. Der j_{21} bleibt gleich oder steigt gegenüber der Kontrolle nur unwesentlich an. Er verhält sich damit wie der j_{31} (68).

Bei erniedrigten Natriumkonzentrationen in den Badelösungen sinkt der SCC nur auf etwa 60% des Kontrollwertes. Der j_{12} verhält sich entsprechend (s. Abb. 35). Als unidirektionaler Einstrom über die äußere Barriere sollte er jedoch eine direkte Abhängigkeit von der Natriumkonzentration im Außenbad zeigen, also auf 1/11 absinken. (Das Potential über die äußere Barriere zeigt keine Abhängigkeit von der Natriumkonzentration im Außenbad (12)). Der j_{21} verhält sich, wie es bei einem passiven extracellulär verlaufenden Natriumfluß auf Grund der verminder-

ten Natriumkonzentration zu erwarten ist: Er sinkt auf 1/9 des Vergleichsertes ab.

Bei der Inhibition des transepithelialen Natriumtransportes durch niedrige Temperaturen (in Abb. 35: Kälte 0°C) sinken j_{12} und SCC gegenüber den Kontrollwerten etwa gleich stark ab. Die Verminderung des j_{21} in der Kälte stimmt mit der auf die Hälfte verminderten Diffusibilität des Natriumions (72) gut überein. Der j_{31} zeigt unter gleichen Bedingungen einen Abfall auf etwa 50% des Wertes bei Kontrollbedingungen (Moshagen, pers. Mitteilung). Die intracellulären Natriumkonzentrationen steigen in der Kälte stark an. In analoger Weise wie bei der Einwirkung von Strophantin wäre daher ein Anstieg des j_{21} zu erwarten gewesen.

Aus Messungen des j_{13} in nicht kurzgeschlossenem Zustand ist bereits bekannt, daß der Natriumeinstrom über die Gesamthaut auf etwa 60% des Wertes unter Kurzschlußbedingungen absinkt (64). Unsere j_{12} -Bestimmungen unter offenen Bedingungen zeigen ein gleichartiges Verhalten des j_{12} . Er sinkt gegenüber Kontrollbedingungen um 30% ab. Legt man die über die äußere Barriere gemessenen Potentialdifferenzen zugrunde, - 16 mV im kurzgeschlossenen Zustand (12) und + 40 mV im nicht kurzgeschlossenen Zustand (45, 28), so wäre jedoch ein stärkeres Absinken des j_{12} (um 70%) zu erwarten. Die in Abbildung 35 angegebene Grösse für den j_{21} ist nicht direkt gemessen, sondern eine aus j_{13} - und j_{31} -Bestimmungen an anderen Häuten und dem j_{12} abgeschätzte Grösse.

Zusätzlich zu den in Abbildung 35 aufgeführten Ergebnissen für die Gesamthaut ist ein an den isolierten Epithelien erhobener Befund zu zitieren: j_{21} und j_{31} sind gegenüber den Werten an der Gesamthaut stark erhöht. Der etwa gleich großen Zunahme von j_{12} und j_{31} entsprach eine gleichfalls stark erhöhte Leitfähigkeit der Haut (s. IV 7.).

Zusammenfassend läßt sich daher das Verhalten der Natriumflüsse über die äußere Barriere wie folgt charakterisieren:

- a) Der j_{21} zeigt bei Bedingungen, die das Potential über die äußere Barriere und die intracellulären Natriumkonzentrationen ändern (Amilorid erniedrigt, Strophantin und Kälte erhöhen die intracellulären Natriumkonzentrationen), keine wesentlichen Änderungen. Der j_{21} verhält sich dagegen bei 10er-Ringer und Kälte, wie man es auf Grund der Verminderung der Natriumkonzentration bzw. der Diffusibilität erwarten sollte. Bei den isolierten Epithelien gingen die Zunahme von Leitfähigkeit, j_{21} und j_{31} , parallel. Die gemessenen Änderungen des j_{21} sprechen für ein Überwiegen der extracellulären Komponente des j_{21} (in Abb. 36: j_{21e}). Der j_{21} entspricht mit seinem Verhalten und mit seiner Größe dem j_{31} . Ein zusätzlicher Austausch von Natrium an der äußeren Barriere, der in einer merklichen Differenz von j_{21} und j_{31} resultieren müßte, ist daher praktisch nicht vorhanden. Ein Natriumausstrom aus dem zellulären Kompartiment ist auf Grund der vorliegenden Messungen nicht nachzuweisen. Die Möglichkeit eines derartigen, allerdings sehr geringen Austauschflusses kann unter Strophantin jedoch nicht völlig abgelehnt werden.
- b) Der beobachtete j_{12} zeigt nicht das auf Grund der Änderung der Natriumkonzentration der äußeren Badelösung und der Änderung des elektrischen Gradienten über die äußere Barriere zu erwartende Verhalten. Der j_{12} reflektiert, wie auch schon unter Kontrollbedingungen, die Änderungen des SCC. SCC und j_{12} sind bis auf geringe Differenzgrößen identisch. Der j_{12} , der Natriumeinstrom in das Epithel, stellt demnach den bereits entscheidenden Schritt des transepithelialen Transportes dar. Dieses Ergebnis widerspricht zum Teil den bisherigen Vorstellungen über den Mechanismus des transepithelialen Natriumtransportes.

3. Kompartimentanalyse

Die Analyse der Einzelschritte des transepithelialen Transportes von Natrium schließt neben der Charakterisierung der Barrieren im Transportweg eine Betrachtung der zwischen diesen Barrieren lokalisierten Natriummengen ("Pools") ein. Die bisher an Epithelien erhobenen Befunde haben Natriummengen aufgezeigt, die zweifellos mit dem transepithelialen Transport in Verbindung stehen (s. Literaturübersicht). Neben der anatomischen Lokalisation der ihnen entsprechenden Verteilungsräume bleibt jedoch auch die Art der Verknüpfung dieser Pools mit dem transepithelialen Transport unsicher. Die Aufklärung des transepithelialen Transportmechanismus verlangt jedoch die Identifizierung eines Natriumtransportpools mit funktionellem Charakter. Abweichend von der üblichen Definition des "aktiven Natriumtransportpools" (37) sollte von einem Transportpool funktioneller Art daher gefordert werden, daß

- a) er einen Natriumverteilungsraum kennzeichnet, der unmittelbar in den Transportweg eingeschaltet ist (z.B. also nicht im "Nebenschluß" liegt),
- b) er nur Natrium umfaßt, das mindestens noch einen entscheidenden Schritt im transepithelialen Transportweg zu überwinden hat, und
- c) seine Größe einen Einfluß auf die Rate des transepithelialen Transportes besitzt.

Die geringe Differenz zwischen SCC und j_{12} und das parallele Verhalten beider Größen unter den bisher diskutierten Bedingungen legt den Schluß nahe, daß der Natriumeinstrom in die Haut den bereits entscheidenden Schritt im transepithelialen Transport darstellt. Ein funktioneller Transportpool sollte nach obiger Definition nicht bereits entscheidend transportiertes Natrium umfassen. Die Flußmessungen an der äußeren Barriere deuten demnach da-

rauf hin, daß ein Transportpool im funktionellen Sinne nicht existiert. Der Mangel an Energiebereitstellung durch ATPasen an der äußeren Barriere (73, 32) steht jedoch der möglichen Schlußfolgerung aus unseren Messungen, daß die äußere Barriere (äußere Membran der Stratum granulosum-Zellen) den eigentlichen Transportschritt leistet, entgegen. Das von Cereijido und Rotunno 1968 vorgeschlagene Modell (s. Abb. 7), bei dem der Transport über die polaren Bindungsstellen der Plasmamembranen der Epithelzellen verläuft (15), könnte diesen Widerspruch auflösen: Die äußere Barriere stellt den entscheidenden Aufnahmeschritt dar, die Energiebereitstellung erfolgt jedoch in der Cytoplasmamembranen, die die Intercellularspalten begrenzen. Ein funktioneller Transportpool wäre nach dieser Modellvorstellung nicht vorhanden oder unmeßbar klein.

Die von uns angewandte Versuchsmethode erlaubt neben der Bestimmung der initialen Aufnahmeraten eine gleichzeitige Bestimmung des maximal von epithel her austauschbaren Natriums ("Transportpool"). Experimente mit langen Versuchszeiten, die an der Gesamthaut (Epidermis mit Corium) durchgeführt wurden, zeigten z.T. nach 4 - 6 min einen Sättigungswert an, der mit $100 - 200 \text{ neq/cm}^2$ mit den in der Literatur angegebenen Transportpoolgrößen übereinstimmt. Aus den Aufnahmekurven war jedoch eine weitere Kompartimentierung dieser Poolgröße nicht zu entnehmen. Aus Auswaschversuchen des Transportpools in unserem Labor (66) und auf Grund von Transportpoolbestimmungen an isolierten Epithelien (1) ist jedoch eine Kompartimentierung dieser Poolgröße zu erwarten. Eine Kompartimentierung müßte sich in einem mehrphasigen Poolaufbau zu erkennen geben: Die Steilheit der Aufnahmekurven sollte abnehmen, nachdem das am schnellsten ausgetauschte Kompartiment gesättigt ist (bzw. dasjenige Kompartiment, das unmittelbar nach der äußeren Barriere lokalisiert ist). Innerhalb der von uns gewählten Gesamtversuchszeiten (30 - 300 sec) war ein der-

artiger Effekt nicht zu beobachten. Ebenso blieben die Aufnahmegeraden bei der Anwendung von Amilorid, Strophantin und Kälte einphasig. Die Identifizierung eines schneller austauschenden Teilkompartments ist jedoch auf Grund der bereits aufgezeigten Eigenschaften der äußeren Barriere nicht zu erwarten. Da eine Rezirkulation von Natrium über die äußere Barriere unter Normalbedingungen nur minimal ist (bzw. nicht nachzuweisen war), sollte die Sättigung eines unmittelbar hinter der äußeren Barriere gelegenen Anteils des Transportpools lediglich eine Verminderung der Nettoaufnahme von wenigen % bewirken. Die Feststellung einer derartig minimalen Änderung der Steilheit der Aufnahmegeraden liegt außerhalb der mit unserer Versuchsanordnung erreichbaren Meßgenauigkeit. Wir haben daher in zwei verschiedenen experimentellen Ansätzen versucht, eine in den Transportweg eingeschaltete Natriummenge in einer von den bisher angegebenen Verfahren abweichenden Weise zu bestimmen.

Die Aufnahmekurven unter Kontrollbedingungen an der isolierten Froschepidermis zeigten im Mittel einen Transportpool von 12 neq/cm^2 (nach Abzug des mittleren Intercept: $9,6 \text{ neq/cm}^2$), der mit Halbwertszeiten von 8 - 22 sec wesentlich schneller als der Transportpool der Gesamthaut ausgetauscht wurde. Aceves und Erløj (1) hatten mit einem anderen Verfahren bereits einen ähnlichen Wert für das isolierte Epithel ermittelt (9 neq/cm^2). Die an dem isolierten Epithel gemessene Größe für den Transportpool ist möglicherweise noch zu groß bestimmt:

- a) Als Korrektur des $^*\text{Na}_{\text{ECR}}$ wurde der mittlere Intercept der Kontrollversuche an der Gesamthaut verwandt. Da das isolierte Epithel nicht genauso stark mit Sucrose abgespritzt werden konnte, mag die Korrektur zu klein sein.
- b) Die im vom Corium her zugänglichen ECR befindliche Tracermenge ist in dem Wert für den Transportpool mit

enthalten.

- c) Die stark erhöhte Leitfähigkeit der isolierten Epithelien führte zu großen Werten für den j_{21} bzw. j_{31} . Der daher gegenüber den Verhältnissen an der Gesamthaut erhöhte Austauschfluß j_{21} könnte die Traceraufnahme des isolierten Epithels erhöht haben.
- d) In einer Vorreihe von Versuchen ergab sich eine Abhängigkeit der ermittelten Natriumpools von den Kurzschlußstromleistungen (s. Abb. 32). Da diese Abhängigkeit nach einer Änderung der Präparationsmethode verloren ging, sind die Transportpoolgrößen möglicherweise nicht funktionell für den Transport bedeutsam.

Die Bestimmung des von epithelial her austauschbaren Natriums an der isolierten Froschepidermis ist kein Beweis für die Existenz eines funktionellen Transportpools. Sie besagt lediglich, daß dieser Pool, so es ihn überhaupt im strengen Sinn der obigen Definition gibt, sehr klein sein muß. Eine weitere Analyse des Verhaltens der mit der hier beschriebenen Methode an den isolierten Epithelien bestimmbaren Poolgrößen unter verschiedenen Bedingungen der Inhibition und Stimulation des Transportes sollte weitere Auskunft über den funktionellen Charakter dieses Pools ergeben.

Der Transportpool des isolierten Epithels liegt in einer Größenordnung, die mit dem gesamten intracellularen Natrium einer einzelnen Zelle gut übereinstimmt. Legt man die an isolierten Epithelien gemessenen intracellulären Natriumkonzentrationen (24 meq/l nach 1, 30) oder die an der Gesamthaut mit der Elektronenstrahlmikroanalyse intracellulär zu beobachtenden Natriumkonzentrationen (10 - 30 meq/l nach 25) zugrunde, so ergeben sich für eine Zelle von 5 - 10 μ Dicke intracelluläre Natriummengen von 5 - 30 neq/cm².

Nachdem die Lokalisation der äußeren Barriere mit der äußeren Zellmembran der Stratum granulosum-Zellen über-

einstimmt (s. Literaturübersicht), bietet sich als Verteilungsraum des Transportnatriums der ICR dieser Zelllage an (s. auch 25, 2, 86). Der transepitheliale Weg des Natriums ließe sich dann, wie in Abbildung 37 (oben) dargestellt, skizzieren: Natrium strömt in die Zellen des Stratum granulosum ein (wobei der aktive oder passive Charakter dieses Einstroms hier nicht diskutiert wird) und wird aktiv in den Intracellularraum weitertransportiert. Die übrigen Zellagen sind an dem Transport nicht direkt beteiligt. Eine Erklärung für die große Diskrepanz, die sich bei gleicher Bestimmungsmethode zwischen der Größe des von epithelial her austauschbaren Natriums an der Gesamthaut ($>100 \text{ neq/cm}^2$) und am isolierten Epithel ($9,6 \text{ neq/cm}^2$) ergibt, kann auf folgende Weise gegeben werden: Bei seinem Weg durch die Intercellularspalten tauscht das radioaktiv markierte Natrium teilweise mit dem Zellnatrium der nachgeschalteten Zellagen aus. Auf diese Weise wird zelluläres Natrium, obwohl es nicht funktionell in den Natriumtransport eingeschaltet ist, markiert. Vom isolierten Epithel ist bekannt, daß seine Intercellularspalten erweitert sind. Zudem ist auf Grund der Entfernung des Coriums ein besserer Austausch mit dem inaktiven Innenbad möglich. Damit sinkt die spezifische Aktivität in den Intercellularspalten und somit auch die Markierungsrate der nicht direkt in den Transport eingeschalteten Zellen. Die an den isolierten Epithelien beobachtete Erhöhung des j_{31} bzw. j_{21} stützt diese Erklärungsmöglichkeit. Da die Diffusibilität des Natriums im Corium vergleichbar mit der Freiwasserdiffusibilität ist, sollte das in den Zellen des Bindegewebes, den Hydrathüllen des Bindegewebeeiweißes und im Lösungswasser des Corium befindliche Natrium sehr weitgehend unmarkiert bleiben und so die Diskrepanz der Poolgrößen an der Gesamthaut und dem isolierten Epithel nicht verursachen können. Der an den Gesamthäuten bestimmte Natriumtransportpool besteht nach dieser Vorstellung zum größten Teil (90%) aus nicht funktionell am Transport betei-

ligtem Natrium. Die schwer erklärbare Konstanz des Pools nach Strophantineinwirkung (68) ließe sich dann so verstehen: Durch den Anstieg der intracellulären Natriumkonzentration wird das Absinken der Markierungsrate des Natriums in den Interzellularspalten gerade so kompensiert, daß die gesamte markierte Natriummenge in etwa konstant bleibt. Die hier skizzierte Erklärung für die Diskrepanz zwischen Transportpoolgrößen des isolierten Epithels und der Gesamthaut trifft jedoch auch für einen grundsätzlich anderen Transportmechanismus zu, wie er in Abbildung 37 (unten) dargestellt ist. Der einzig entscheidende Transportschritt ist hier an der äußeren Barriere lokalisiert (tight junctions). Die meßbaren Transportgrößen umfassen dann jeweils nur bereits transportiertes Natrium.

Durch einen besonderen experimentellen Ansatz war es möglich, auch an der Gesamthaut einen Natriumpool zu ermitteln, der mit 18 neq/cm^2 und einer Halbwertszeit des Poolaufbaus von ca. 10 sec mit dem Transportpool des isolierten Epithels vergleichbare Daten aufweist. Bei dieser Methode, die darauf beruht, daß der Pool aus der Differenz von j_{12} und SCC bestimmt wird, wird das bereits in den Extracellulärraum der Haut (Interzellularraum und Corium) transportierte Natrium eliminiert (s. IV) 8.). Bei dem Vergleich der beiden Poolgrößen ist jedoch zu berücksichtigen, daß der Pool an der Gesamthaut nach langzeitiger Inkubation in natriumfreien Lösungen bestimmt wurde. Die Permeabilität der äußeren Barriere (11) und der veränderte Funktionszustand der Transportenzyme könnte Differenzen in der Größe der Poolmessungen bewirken, obwohl mit beiden Methoden der gleiche Verteilungsraum bestimmt wird. Die Tatsache, daß der überschießende Anteil des SCC nach dem Konzentrationswechsel mit der gleichen Zeitcharakteristik abfällt wie der Pool aufgebaut wird, deutet darauf hin, daß der aus der Differenz von Nettonatriumaufnahme und Nettoladungsaufnahme berechnete Pool eher

zu klein bestimmt ist. Der Teil des eingeströmten Natriums, der durch (a) einen K-Ausstrom über die innere Barriere oder (b) durch einen Chlorideinstrom in das Kompartiment aus dem Innenbad im Ladungsstrom sichtbar wird, ist in der Poolgröße nicht mit erfaßt. Interpretiert man den phasischen Anteil des SCC (s. Abb. 34) als einen derartigen zusätzlichen Poolanteil, so vergrößert sich der Wert für den Transportpool um ca. 30% (auf ca. 24 neq/cm^2). Der mit diesem Verfahren ermittelte Transportpool zeigte eine Abhängigkeit vom Transportzustand der Haut. Durch Amilorid in der epithelialen Badelösung wurde seine Größe stark reduziert. Selbst bei Zugabe von Amilorid (10^{-3} M) erst mit der 110er-Testlösung war der Pool praktisch nicht mehr nachzuweisen (s. Tab. 4 mittlere Zeile). Strophantin (in der Vorinkubation bereits zugegeben) hemmt den Poolaufbau offensichtlich nur geringfügig (Einzelversuche). Gegen den funktionellen Charakter der ermittelten Natriummenge läßt sich der Verlauf des SCC während der Aufladephase anführen (vergl. Abb. 34): Während sich der Transportpool aufbaut, sollte eigentlich der transcelluläre Natriumtransport, also auch der SCC, größer werden. Der gegenteilige Verlauf des SCC ist jedoch möglicherweise auf einen mit dem Poolaufbau in Verbindung stehenden Na/K (bzw. Na/Cl) Austauschmechanismus zurückzuführen (s.o.), wie er bereits unter anderen Versuchsbedingungen an der Froschhaut beobachtet werden konnte (68).

Das eng gekoppelte Verhalten von j_{12} und SCC deutet auf eine hohe Effektivität des Aufnahmeschrittes im Natriumtransportweg hin. Die Ergebnisse der Flußmessungen stützen die Annahme eines aktiven oder "quasi-aktiven" Aufnahmeschrittes. Die Nichtexistenz oder Existenz eines nur sehr kleinen Transportpools würde einen derartig quasi-aktiven (d.h. mit der Nettonatriumbewegung eng gekoppelten) Mechanismus bewirken. Ein transcellulärer Weg, bei dem das Natrium einen Verteilungsraum, der zwischen zwei

entscheidenden Permeationsbarrieren lokalisiert ist, passiert, ist auf Grund der erhobenen Befunde nur möglich, wenn

1. das Transportkompartiment sehr klein ist
2. der elektrische Gradient über die äußere Barriere sehr stark einwärts gerichtet ist, oder
3. neben einem aktiven Transport aus dem Transportkompartiment der Eintritt in das Kompartiment ebenfalls aktiv erfolgt (Abb. 37 Mitte).

Wenn es überhaupt einen funktionellen Transportpool gibt, so stimmen die beiden kleinen Poolgrößen (12 bzw. 18 neq/cm²) besser mit dem beobachteten Verhalten des j_{12} und j_{21} überein, als der sehr große Transportpool der Gesamthaut. Unter der Voraussetzung, daß der Natriumrückstrom aus diesem Kompartiment (j_{21}) nur minimal ist, kann der Aufbau dieser 10 - 20 neq/cm² in den Aufnahmegraden nicht bemerkt werden (s.o.). Der äußerst geringe Natriumrückstrom aus diesem Kompartiment macht jedoch eine Charakterisierung der äußeren Barriere notwendig, die von den bisherigen Beobachtungen in der Literatur abweicht. Unter Normalbedingungen sollte ein stark einwärts gerichteter elektrischer Gradient den Natriumeinstrom fördern. Die Beobachtung eines selbst unter nicht kurzgeschlossenen Bedingungen an der äußeren Barriere auftretenden negativen Potentialsprunges (Nagel, pers. Mitteilung) läßt dies möglich erscheinen. Dieser elektrische Gradient könnte durch eine nicht elektroneutrale Natriumpumpe an der inneren Barriere generiert werden. Durch Inhibition dieser Pumpe mit Strophantin würde der elektrisch fördernde Gradient über die äußere Barriere entfallen. Dieser Mechanismus kann die scheinbare Permeabilitätsabnahme der äußeren Barriere bei Anwendung von Strophantin erklären. Eine mögliche Änderung des Potentials über die äußere Barriere könnte ebenso wie die beobachtete Änderung der intracellulären Natriumkonzentration (25) die

Membraneeigenschaft so beeinflussen, daß es zu einer tatsächlichen Verminderung der Natriumpermeabilität kommt. In analoger Weise läßt sich das Ergebnis bei Kälteinhibition verstehen.

Ein Transportmechanismus, bei dem der Eintritt in das Transportkompartiment unter Normalbedingungen durch einen elektrischen Gradienten gefördert wird, reduziert einerseits den Verlust an Natrium (und Kalium) an die äußere Umgebung entscheidend, der Energiebedarf je transportiertes Natrium wird dadurch jedoch gesteigert.

Die Ergebnisse schließen die Existenz eines sehr schnell austauschenden Transportkompartments nicht aus. Bei Austausch-Halbwertzeiten von < 2 sec wäre der Pool bereits beim Hautstück mit der kürzesten Expositionszeit (5 sec) vollständig markiert. Der Aufbau eines derartig schnell sich austauschenden Kompartments könnte dann in den Aufnahmegeraden nicht beobachtet werden. Seine maximale Größe ist aber durch den gemessenen Intercept begrenzt ($2,4 \text{ neq/cm}^2$). Zum einen bietet sich kein morphologisches Korrelat für ein so kleines Kompartiment an, zum anderen läßt sich der beobachtete Intercept leichter auf andere Art interpretieren (s. III) 6.5.2.). Die bisher gemachten Aussagen über den j_{21} wären für ein derartig kleines Transportkompartiment nicht gültig. In diesem (theoretischen) Fall könnten größere Austauschflüsse zwischen dem Außenbad und dem Kompartiment existieren.

Das Ergebnis der Flußbestimmungen an der äußeren Barriere läßt einen Transportmechanismus möglich erscheinen, wie er in Abbildung 37 in der Mitte skizziert ist. Die Natriumtransportpumpe an der äußeren Barriere sollte dann durch das im Innenbad applizierte Strophantin ebenso gehemmt werden, wie durch Amiloridzugabe im Außenbad. Dieses Modell kann jedoch die Differenz zwischen den Transportpoolgrößen an der Gesamthaut und am isolierten Epithel nicht befriedigend erklären.

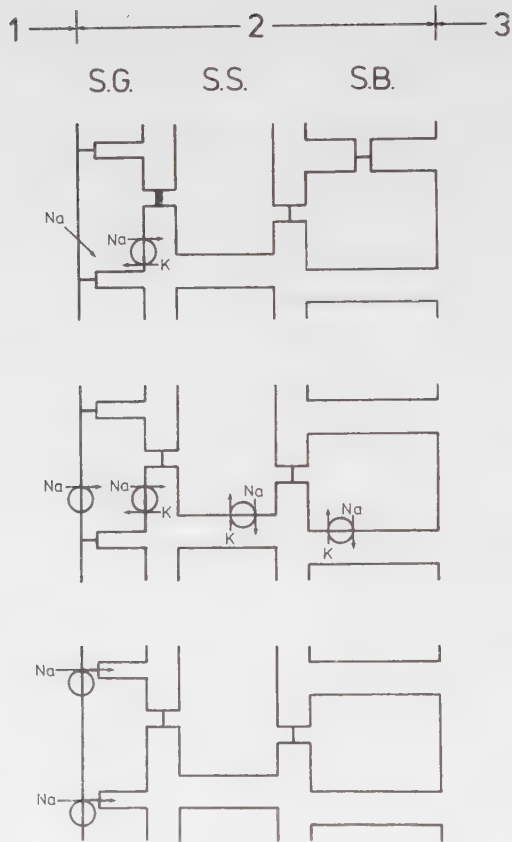


Abb. 37: Modelle des transepithelialen Natriumtransportes.

S.G. = Stratum granulosum

S.S. = Stratum spinosum

S.B. = Stratum basale (~germinativum)

Erläuterung im Text.

Neben diesen Vorstellungen, die von der Existenz eines Transportkompartments ausgehen, gibt es die Alternative eines transepithelialen Transportmechanismus ohne ein funktionelles Transportkompartiment. Das Natrium wird nur über eine Barriere transportiert, die nach den vorliegenden Ergebnissen am ehesten in den tight junctions der Stratum granulosum-Zellen lokalisiert ist (s. Abb. 37 unten).

Außer der Tatsache, daß diese Denkmöglichkeit die einfachste Erklärung für die nahezu Identität von j_{12} und SCC bietet, lassen sich zwei weitere Argumente anführen: Bei den Versuchen mit gleichzeitiger Applikation von Tracer-Natrium und Amilorid ließ sich keine Zeitverschiebung zwischen der Wirkung auf die Natriumaufnahme und der Wirkung auf den SCC beobachten. Ein Transportkompartiment sollte (bei einer chloridpermeablen äußeren Membran) eine Wirkungsverspätung beim Kurzschlußstrom bedingen. Beim Flutvorgang unter Kurzschlußbedingungen werden Abschnitte, die (wenn auch durch die Art der Versuchsdurchführung nur sehr kurze Zeit) nicht kurzgeschlossen waren, erneut kurzgeschlossen. Da der j_{12} unter Kurzschlußbedingungen und im nicht kurzgeschlossenen Zustand unterschiedlich ist, sind an den Übergangszonen non-steady state-Werte für den j_{12} und den SCC zu erwarten. SCC-Verläufe bei An- und Abfluten an einer Haut ergaben jedoch identische Kurvenverläufe der SCC-Schreibung (eine minimale Hysteresis, die einer Ladungsverchiebung von $0,5 \text{ neq/cm}^2$ entsprach, konnte z.T. beobachtet werden). Die Aufnahmegeraden zeigten keine Abweichung von der Linearität, der Intercept war gegenüber den Versuchen im nicht kurzgeschlossenen Zustand nicht verändert. Die Beobachtung einer Dissoziation von Natriumaufnahme und Kurzschlußstrom beim Wechsel von natriumfreier Inkubationslösung auf normale 110er-Ringer-Testlösung widerspricht jedoch einem solchen Transportmechanismus. Aller-

dings läßt sich nicht ausschließen, daß nach den langen Inkubationszeiten in natriumfreien Lösungen ein zelluläres Kompartiment ausgetauscht werden kann, das unter Kontrollbedingungen nicht austauscht und nicht funktionell in den Transport eingeschaltet ist.

Die Frage nach dem transepithelialen Transportweg kann auf Grund der vorhandenen Ergebnisse nicht eindeutig beantwortet werden. Eine Beteiligung eines allerdings kleinen Transportkompartments (ICR der Stratum granulosum-Zellen?) bleibt möglich, wobei jedoch Zusatzannahmen notwendig sind, die die hohe Effektivität des Aufnahmeschrittes erklären (fördernder elektrischer Gradient?, aktiver Aufnahmeschritt?). Ein transepithelialer Transportweg ohne ein funktionelles Transportkompartiment ist denkbar, die Problematik, die durch den Mangel an Energiebereitstellung an der äußeren Barriere begründet ist, wird bei dem von Cereijido und Rotunno (15) vorgeschlagenen Transportmodell umgangen. Eine nicht modifizierte 3-Kompartiment-Vorstellung ist mit den Befunden nicht in Übereinstimmung zu bringen.

VI) ZUSAMMENFASSUNG

Mit einer Modifikation der von Cereijido angegebenen Methode zur Bestimmung der Natriumaufnahme an der isolierten Froschhaut konnten der Natriumeinstrom (j_{12}) und der -ausstrom (j_{21}) gemessen werden. Während der Natriumeinstrom (j_{12}) wie von Cereijido angegeben aus der Natriumaufnahme bestimmt wurde, konnte der Natriumausstrom (j_{21}) zusätzlich aus der gleichzeitigen Bestimmung des Kurzschlußstromes (SCC) ermittelt werden.

Die Austauschflüsse über die äußere Barriere des Froschhautepithels (j_{12} und j_{21}) wurden unter Kontrollbedingungen (bds. Ringerlösung) und nach Hemmung des trans-epithelialen Natriumtransportes durch Amilorid (10^{-4} M), Strophantin (10^{-4} M), niedrige Temperaturen (0° C) und niedrige Natriumkonzentrationen der Ringerlösung ermittelt. Außerdem wurde die Natriumaufnahme unter nicht kurzgeschlossenen Bedingungen bestimmt.

In der Kontrolle ist der Natriumeinstrom in das Epithel (j_{12}) nur geringfügig größer als der Nettonatriumtransport (SCC). Der Natriumausstrom (j_{21}) beträgt nur 7% der Natriumaufnahme. Im nicht kurzgeschlossenen Zustand beträgt der j_{12} 75% des Kontroll-SCC. Unter den Bedingungen der Transportinhibition nahm der Natriumeinstrom in die Haut (j_{12}) im gleichen Maß wie der Nettofluß (SCC) ab. Während nach Amilorid und Strophantin der j_{21} gegenüber der Kontrolle im Wesentlichen unverändert blieb, fiel er in der Kälte und bei verminderter Natriumkonzentration ab.

Die Flußmessungen zeigen also, daß im Gegensatz zu der bisherigen Annahme für das Natriumion keine großen Austauschflüsse an der äußeren Barriere existieren.

Mit derselben Versuchsanordnung wurde an der Froschhaut ein Natriumtransportpool bestimmt, der mit 18 neq/cm^2

nur einen Bruchteil der bisher gemessenen Transportpoolgrößen ausmacht. Am isolierten Epithel der Froschhaut wurde ein Transportpool von $9,6 \text{ neq/cm}^2$ ermittelt.

Die Ergebnisse widersprechen z.T. den bisherigen Annahmen über den transepithelialen Transportweg des Natriums. Die äußere Zellmembran der Stratum granulosum-Zellen, die der äußeren Permeationsbarriere für den Natriumtransport entspricht, stellt zumindest unter Normalbedingungen (isotone Froschringerlösung) bereits den entscheidenden Schritt für die transepitheliale Natriumaufnahme dar.

VII) ANHANG

1. Häufig verwendete Abkürzungen, Maßeinheiten

j_{nm}	=	Natriumfluß von Kompartiment n nach Kompartiment m (vergl. Abb. 3) [$\mu\text{eq Na} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$]
PD	=	Potentialdifferenz über die Haut, das Vorzeichen bezeichnet die Poolung der Blutseite relativ zur Außenseite [mV]
SCC	=	Kurzschlußstrom [$\mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$] oder [$\mu\text{eq Na} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$]
ICR	=	Intracellularraum
ECR	=	Extracellularraum
*Na	=	Aus der Traceraufnahme kalkulierte Natriumaufnahme [$\text{neq Na} \cdot \text{cm}^{-2}$]
*Na _{ECR}	=	Extracellulär lokalisierte, mit Tracer markierte Natriummenge [$\text{neq Na} \cdot \text{cm}^{-2}$]
P _n	=	Spezifische Aktivität im Kompartiment n [cpm/neq Na]
C _S	=	Traceraufnahme der Haut bzw. einzelner Hautstücke [cpm $\cdot \text{cm}^{-2}$]
C ₂	=	Traceraufnahme der Haut im Kompartiment 2 (jenseits der äußeren Barriere) [cpm $\cdot \text{cm}^{-2}$]
t _S	=	Kontaktzeit der einzelnen Hautstücke (Expositionszeit) [sec]

2. Literaturangaben

- 1) Aceves, J., und D. Erlij:
Sodium transport across the isolated epithelium of the frog skin.
J.Physiol. 212, 195 (1971)
- 2) Aceves, J.:
Localization probable del compartimiento de transporte activo de Na del epithelio de la piel de rana.
Persönliche Mitteilung
- 3) Andersen, B., und K. Zerahn:
Method for non-destructive determination of the sodium transport pool in frog skin with radio sodium.
Acta Physiol.Scand. 59, 319 (1963)
- 4) Biber, T.U.L., und P.F. Curran:
Direct measurement of uptake of sodium at the outer surface of the frog skin.
Physiologist 12, 176 (1969)
- 5) Biber, T.U.L., und P.F. Curran:
Direct measurement of uptake of sodium at the outer surface of frog skin.
J.Gen.Physiol. 56, 83 (1970)
- 6) Biber, T.U.L.:
Effect of changes in transepithelial transport on the uptake of sodium across the outer surface of the frog skin.
J.Gen.Physiol. 58, 131 (1971)
- 7) Biber, T.U.L., L. Cruz und P.F. Curran:
Sodium influx at the outer surface of the frog skin.
J.Membrane Biol. 7, 365 (1972)
- 8) Du Bois-Reymond, E.:
Untersuchungen über tierische Elektrizität.
Berlin 1848
- 9) Candia, O.A.:
The hyperpolarizing region of the current-voltage curve in frog skin.
Biophys.J. 10, 323 (1970)
- 10) Candia, O.A., und J.A. Zadunaisky:
K⁺-flux and Na⁺-transport in the isolated frog skin.
Biochim.Biophys.Acta 255, 517 (1972)
- 11) Cereijido, M., F. Herrera, W.J. Flanigan und P.F. Curran:
The influence of Na concentration on Na-transport across frog skin.
J.Gen.Physiol. 47, 879 (1964)

- 12) Cereijido, M., und P.F. Curran:
Intracellular electric potentials in frog skin.
J.Gen.Physiol. 48, 543 (1965)
- 13) Cereijido, M., und C.A. Rotunno:
Transport and distribution of sodium across the frog skin.
J.Physiol. 190, 481 (1967)
- 14) Cereijido, M., I. Reisin und C.A. Rotunno:
The effect of sodium concentration on the content and distribution of sodium in the frog skin.
J.Physiol. 198, 237 (1968)
- 15) Cereijido, M., und C.A. Rotunno:
Fluxes and distribution of sodium in frog skin. A new model.
J.Gen.Physiol. 51, 280 (1968)
- 16) Cereijido, M., und C.A. Rotunno:
The effect of antidiuretic hormone on Na movement across frog skin.
J.Physiol. 213, 119 (1971)
- 17) Clarkson, T.W., und B. Lindemann:
Experiments on Na transport of frog skin epithelium.
In: Laboratory techniques in membrane biophysics.
Springer, Berlin-Heidelberg-New York (1969)
- 18) Cope, F.W.:
Structured water and complexed Na^+ and K^+ in biological systems.
Symposion on water structure at the water-polymer interface, Los Angeles (1971)
- 19) Curran, P.F., F.C. Herrera und W.J. Flanigan:
The effect of Ca and antidiuretic hormone on Na transport across frog skin. II. Sites and mechanisms of action.
J.Gen.Physiol. 46, 1011 (1962)
- 20) Curran, P.F., und M. Cereijido:
 K^+ -fluxes in frog skin.
J.Gen.Physiol. 48, 1011 (1965)
- 21) Dainty, J., und C.R. House:
Unstirred layers in frog skin.
J.Physiol. 182, 66 (1966)
- 22) Dörge, A., und W. Nagel:
Intracelluläre Natriumkonzentration der isolierten Froschhaut bei Variation der Natriumkonzentration der Badlösung.
Pflügers Arch. 307, 56 (1969)

- 23) Dörge, A., und W. Nagel:
Effect of Amiloride on sodium transport in the frog skin: II. Sodium transport pool and unidirectional fluxes.
Europ.J.Physiol. 321, 91 (1970)
- 24) Dörge, A., und W. Nagel:
Washout kinetics of Na from the transport pool to the epithelial and corium side of the frog skin.
Pflügers Arch. 337, 285 (1972)
- 25) Dörge, A., K. Gehring, W. Nagel und K. Thureau:
Intracellular Na^+ - K^+ concentration of frog skin at different states of Na transport.
Im Druck (1973)
- 26) Eigler, J., J. Kelter und E. Renner:
Wirkungscharakteristika eines neuen Acylguanidins - Amiloride-HCl (MK 870) - an der isolierten Haut von Amphibien.
Klin.Wschr. 14, 737 (1967)
- 27) Emilio, M.G., M.M. Machada und H.P. Menano:
The production of a hydrogen ion gradient across the isolated frog skin. Quantitative aspects and the effect of acetazolamide.
Biochim.Biophys.Acta 203, 394 (1970)
- 28) Engbaek, L., und T. Hoshiko:
Electrical potential gradients through the frog skin.
Acta Physiol.Scand. 39, 384 (1957)
- 29) Erlij, D., und M. Smith:
Sodium uptake by the outside surface of frog skin.
J.Physiol. 218, 33p (1971)
- 30) Erlij, D.:
Salt transport across isolated frog skin.
Phil.Trans.Roy.Soc. London B 262, 153 (1971)
- 31) Farquhar, M.G., und G.E. Palade:
Cell junction in amphibian skin.
J.Cell.Biol. 26, 263 (1965)
- 32) Farquhar, M.G., und G.E. Palade:
Adenosine triphosphatase localization in amphibian epidermis.
J.Cell.Biol. 30, 359 (1966)
- 33) Ferreira, K.T.G., M.M. Guerreiro und H.G. Ferreira:
Kinetic characterization of the chloride dependence of sodium transport in the frog skin.
Biochim.Biophys.Acta 291, 269 (1973)

- 34) Finkelstein, A.:
Electrical excitability of isolated frog skin and toad bladder.
J.Gen.Physiol. 47, 545 (1964)
- 35) Fisher, R.A.:
Statistical methods for research workers.
Hafner, New York (1958)
- 36) Force, R.C.:
Device to measure the voltage-current relation in biological membranes.
Rev.Sci.Instr. 38, 1225 (1967)
- 37) Frazier, H.S., E.F. Dempsey und A. Leaf:
Movement of sodium across the mucosal surface of the isolated toad bladder and its modification by vasopressin.
J.Gen.Physiol. 45, 529 (1962)
- 38) Frazier, H.S., und A. Leaf:
The electrical characteristics of active sodium transport in the toad bladder.
J.Gen.Physiol. 46, 491 (1963)
- 39) Fuhrman, F.A.:
Inhibition of active sodium transport in the isolated frog skin.
Amer.J.Physiol. 171, 266 (1952)
- 40) Galeotti, G.:
Über die elektromotorischen Kräfte, welche an der Oberfläche tierischer Membranen bei der Berührung mit verschiedenen Elektrolyten zustande kommen.
Z.Phys.Chem. 49, 542 (1904)
- 41) Helman, S.I., und D.A. Miller:
In vitro techniques for avoiding edge damage in studies of frog skin.
Science 173, 146 (1971)
- 42) Geigy, Wissenschaftliche Tabellen.
Geigy, Basel, Schweiz (1969) 7. Auflage
- 43) Gamble, J.L.:
Chemical anatomy, physiology and pathology of extracellular fluid.
Cambridge, Mass., 1954
- 44) Hokin, L.E.:
On the molecular characterization of the sodium-potassium transport adenosine triphosphatase.
J.Gen.Physiol. 54, 327 (1969)

- 45) Hoshiko, T., und L. Engbaek:
Microelectrode study of the frog skin potential.
Abstract Com.20th Int.Physiol.Congress Brüssel (1956),
443
- 46) Hoshiko, T., und H.H. Ussing:
The kinetics of Na^{24} flux across amphibian skin and
bladder.
Acta Physiol.Scand. 49, 74 (1960)
- 47) Huf, E.:
Versuche über den Zusammenhang zwischen Stoffwechsel,
Potentialbildung und Funktion der Froschhaut.
Pflügers Arch. 235, 655 (1935)
- 48) Huf, E.G., J.P. Wills und M.F. Arrighi:
Electrolyte distribution and active salt uptake in frog
skin.
J.Gen.Physiol. 38, 867 (1955)
- 49) Khuri, R., J.J. Hajjar, S. Agulian, K. Bogharian, A.
Kalloghlian und H. Bizri:
Intracellular potassium in cells of the proximal tubule
of *Necturus maculosus*.
Pflügers Arch. 338, 73 (1972)
- 50) Kidder, G.W., M. Cereijido und P.F. Curran:
Transient changes in electrical potential differences
across frog skin.
Amer.J.Physiol. 207 (4), 935 (1964)
- 51) Kirschner, J.B.:
The effect of atropine and the curares on the active
transport of sodium by the skin of *Rana esculenta*.
J.Cell.Comp.Physiol. 45, 89 (1955)
- 52) Koefoed-Johnsen, V., H. Levi und H.H. Ussing:
The mode of passage of chloride ions through the iso-
lated frog skin.
Acta Physiol.Scand. 25, 150 (1952)
- 53) Koefoed-Johnsen, V., H.H. Ussing und K. Zerahn:
The origin of the short-circuit current in the adrena-
line stimulated frog skin.
Acta Physiol.Scand. 27, 38 (1953)
- 54) Koefoed-Johnsen, V.:
The effect of g-strophantin (ouabain) on the active
transport of sodium through the isolated frog skin.
Acta Physiol.Scand. 42, Suppl. 145, 87 (1957)
- 55) Koefoed-Johnsen, V., und H.H. Ussing:
The nature of the frog skin potential.
Acta Physiol.Scand 42, 298 (1958)

- 56) Kreyszig, E.:
Statistische Methoden und ihre Anwendungen.
Vandenhoeck und Ruprecht, Göttingen (1968)
- 57) Kristensen, P.:
Chloride transport across isolated frog skin.
Acta Physiol.Scand. 84, 338 (1972)
- 58) Krogh, A.:
Osmotic regulation in the frog (*R. esculenta*) by active
absorption of chloride ions.
Skand.Arch.Physiol. 76, 60 (1937a)
- 59) Krogh, A.:
The active absorption of ions in some fresh water ani-
mals.
Zeitschr.vergl.Physiol. 25, 335 (1938)
- 60) Leaf, A., und A. Renshaw:
Ion transport and respiration of isolated frog skin.
Biochem.J. 65, 82 (1957)
- 61) Leaf, A.:
Transepithelial transport and its hormonal control in
toad bladder.
Ergebnisse der Physiologie 56, 216 (1965)
- 62) Lindley, B.D., und T. Hoshiko:
The effect of alkali kation and common anions on the
frog skin potential.
J.Gen.Physiol. 47, 749 (1964)
- 63) Loewenstein, W.R.:
Intracellular communication.
Scientific American 222,5, 78 (1970)
- 64) Lyttkens, L.:
The sodium transport pool in frog skin under open- and
short-circuit conditions.
Acta Physiol.Scand. (1972) preprint
- 64a) Macey, R.I., und D.C. Koblick:
Effects of choline and other quaternary ammonium com-
pounds on Na movements in frog skin.
Amer.J.Physiol. 205, 1063 (1963)
- 65) Moreno, J.H., I.L. Reisin, E. Rodriguez Boulan, C.A.
Rotunno und M. Cereijido:
Barriers to sodium movement across frog skin.
J.Membrane Biol. 11, 99 (1973)

- 66) Moshagen, D., W. Nagel und A. Dörge:
Washout of tracer Na from the frog skin. (Auswaschanalyse von Isotopen-Na an der Froschhaut).
Referat Nr. 125 der 41. Tagung der Deutschen Physiologischen Gesellschaft, Düsseldorf, 1973
- 67) Nagel, W., und A. Dörge:
Effect of amiloride on sodium transport of frog skin.
I. Action on intracellular sodium content.
Pflügers Arch. 317, 84 (1970)
- 68) Nagel, W., und A. Dörge:
A study of the different sodium compartments and the transepithelial sodium fluxes of the frog skin with the use of ouabain.
Pflügers Arch. 324, 267 (1971)
- 69) Parson, P.H., und T. Hoshiko:
Separation of epithelium from frog skin and rapid wash-out of ^{22}Na .
J.Gen.Physiol. 57, 254 (1971)
- 70) Porter, G.A.:
Temperature dependence of Na^+ transport in the isolated toad bladder.
Biochim.Biophys.Acta 211, 487 (1970)
- 71) Rawlins, F., L. Mateu, F. Fragachan und G. Whittembury:
Isolated toad skin epithelium: Transport characteristics.
Pflügers Arch. 316, 64 (1970)
- 72) Robinson, R.A., und R.H. Stokes:
Electrolyte solutions.
Butterworth, London (1959)
- 73) Rotunno, C.A., M. Pouchan und M. Cereijido:
Location of the mechanism of active sodium transport across the frog skin.
Nature 210, 597 (1966)
- 74) Rotunno, C.A., V. Kowalewski und M. Cereijido:
Nuclear spin resonance evidence for complexing of sodium in frog skin.
Biochim.Biophys.Acta 135, 170 (1967)
- 75) Rotunno, C.A., F.A. Villalonga, M. Fernandez und M. Cereijido:
The penetration of sodium into the epithelium of the frog skin.
J.Gen.Physiol. 55, 716 (1970)

- 76) Schneider, W.:
Ergebnisse von in vitro-Versuchen über den Chlorid- und Paraaminohippursäure-Transport an der Haut von Rana esculenta.
Inauguraldisseration, Ludwig Maximilians-Universität München, 1972
- 77) Schoffeniels, E.:
An isolated single electroplax preparation. II. Improved preparation for studying ion flux.
Biochim.Biophys.Acta 26, 585 (1957)
- 78) Sen, A.K., und R.L. Post:
Stoichiometry and localization of ATP-dependent sodium and potassium transport in the erythrocyte.
J.Biol.Chem. 239, 345 (1964)
- 79) Takenaka, T.:
Effects of temperature and metabolic inhibitors on the active Na-transport in frog skin.
Japan J.Physiol. 13, 208 (1963)
- 80) Ussing, H.H.:
The active ion transport through the isolated frog skin in the light of tracer studies.
Acta Physiol.Scand. 17, 1 (1948a)
- 81) Ussing, H.H.:
The distinction by means of tracers between active transport and diffusion.
Acta Physiol.Scand. 19, 43 (1950)
- 82) Ussing, H.H., und K. Zerahn:
Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuit isolated frog skin.
Acta Physiol.Scand. 23, 110 (1951)
- 83) Ussing, H.H.:
The frog skin potential.
J.Gen.Physiol. 43, 135 (1960)
- 84) Ussing, H.H., und E. Windhager:
Nature of shunt path and active sodium transport path through frog skin epithelium.
Acta Physiol.Scand. 61, 484 (1964)
- 85) Ussing, H.H., T.U.L. Biber und N.S. Bricker:
Exposure of the isolated frog skin to high potassium concentrations at the internal surface. II. Changes in epithelial cell volume, resistance and response to antidiuretic hormone.
J.Gen.Physiol. 48, 425 (1964)

- 86) Voute, C.L., und H.H. Ussing:
Quantitative relation between hydrostatic pressure gradient, extracellular volume and active sodium transport in the epithelium of the frog skin.
Exp.Cell.Res. 62, 375 (1970)
- 87) Walcher, W.:
Praktikum der Physik.(Fehlerrechnung).
B.G. Teubner, Stuttgart (1966)
- 88) Whittembury, G., und J. Fishman:
Relation between cell Na extrusion and transtubular absorption in the perfused toad kidney: The effect of K, ouabain and ethacrynic acid.
Pflügers Arch. 307, 138 (1969)
- 89) Zadunaisky, J.A., O.A. Candia und D.J. Chiarandini:
The origin of the short circuit current in the isolated skin of the South American frog *Leptodactylus ocellatus*.
J.Gen.Physiol. 47, 393 (1963)
- 90) Zerahn, K.:
Oxygen consumption and active sodium transport in the isolated and short-circuited frog skin.
Acta Physiol.Scand. 36, 300 (1956)
- 91) Zerahn, K.:
Nature and localization of the sodium pool during active transport in the isolated frog skin.
Acta Physiol.Scand. 77, 272 (1969)

Herrn Professor Dr.med. K. Thureau danke ich für die Überlassung des Themas, die Arbeitsmöglichkeit in seinem Institut und das Interesse, das er der Durchführung und Zusammenstellung der Untersuchungen widmete.

Herrn Dr. A. Dörge und Herrn Privatdozent Dr. W. Nagel möchte ich für die Unterstützung der Arbeit durch die vielen kritischen Diskussionen und wertvollen Anregungen danken.

Weiterhin danke ich Fräulein E. von Arnim für ihre große Hilfe bei der Durchführung der Versuche und Fräulein Ch. Jenke für die ausgezeichnete Niederschrift dieser Arbeit.

Lebenslauf

Am 7. Juni 1946 wurde ich als viertes Kind meiner Eltern Karen Rick, geb. Stokke, und Dr.med. Bruno Rick in Erkrath (bei Düsseldorf) geboren. Ab 1953 besuchte ich die Katholische Volksschule in Erkrath, ab 1957 das Konrad-Heresbach-Gymnasium im nahegelegenen Mettmann. 1962 zog die Familie nach Bernau am Chiemsee um. Bis zur Ablegung der Reifeprüfung 1966 besuchte ich das Ludwig-Thoma-Gymnasium in Prien/Chiemsee. 1966 - 1968 leistete ich meine Wehrpflicht bei der Bundeswehr ab. Von 1968 - 1973 studierte ich Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität in München. Am 18.12.1973 bestand ich die ärztliche Prüfung.

